

Université de Montréal

**Impact de l'extraction tissulaire sur les paramètres pharmacocinétiques et  
pharmacodynamiques du rémifentanyl chez les chiens anesthésiés**

par

Meriam Kabbaj

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Novembre, 2004

© Meriam Kabbaj, 2004



QV

705

U58

2005

v.004

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Impact de l'extraction tissulaire sur les paramètres pharmacocinétiques et  
pharmacodynamiques du rémifentanil chez les chiens anesthésiés**

présentée par :  
Meriam Kabbaj

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. Line Labbé, président-rapporteur

Prof. France Varin, directeur de recherche

Prof. Pascal Vachon, co-directeur

Prof. Pierre Beaulieu, membre du jury

Prof. Jacques Somma, examinateur externe

-----, représentant du doyen de la FES



## Résumé

Le rémifentanyl (RMF) est un analgésique opioïde puissant de la famille des phénylpipéridines. Sa durée d'action extrêmement courte permet aux anesthésiologistes de titrer l'effet au cours de l'intervention, sans compromettre la récupération des patients. Le RMF doit ses propriétés évanescentes à la présence d'une fonction ester susceptible d'être hydrolysée par les estérases tissulaires pour conduire à son métabolite acide, le déméthoxy-RMF. L'analyse pharmacocinétique-pharmacodynamique de molécules arborant un profil cinétique plus traditionnel admet que les concentrations artérielles décrivent mieux l'effet pharmacologique. D'un point de vue pharmacocinétique, on préconise de choisir le même site pour l'administration du médicament et le prélèvement des échantillons sanguins afin de dériver les paramètres tels que la clairance, le volume central de distribution et le volume de distribution à l'équilibre. Le but de mon travail de recherche consistait à vérifier ces présomptions pour un médicament tel que le RMF, soumis à une extraction tissulaire dans la biophase et dans le compartiment périphérique. Il s'agissait dans un premier temps, de comparer les concentrations de RMF dérivées, dans le compartiment effet sur la base de prélèvements artériels, à celles mesurées directement dans le liquide cébrospinal, à l'équilibre. Notre deuxième objectif consistait à comparer les concentrations dans le compartiment périphérique dérivées à partir de concentrations artérielles à celles mesurées directement dans le liquide intersititiel musculaire par une technique de microdialyse. L'impact du site d'échantillonnage artériel ou veineux sur l'estimation des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques a également été évalué. Ainsi, la première partie du protocole *in vivo* incluait une étude pharmacocinétique-pharmacodynamique au cours de laquelle nous avons mesuré l'activité électroencéphalographique suite à l'administration de deux courtes perfusions de RMF à des chiens préalablement anesthésiés. Deux heures après, le RMF a été perfusé une fois de plus pendant une heure et des prélèvements simultanés ont été effectués à l'équilibre dans la veine et l'artère fémorales, la veine jugulaire, le liquide interstitiel et le liquide céphalorachidien. Nos résultats indiquent que le RMF subit une importante extraction dans le muscle (37%) et le cerveau (34%). Dans les deux cas, les concentrations veineuses fémorales et jugulaires



permettent une meilleure estimation des concentrations mesurées dans le liquide interstitiel musculaire et le liquide céphalorachidien. Nos observations révèlent avant tout, l'importance du site d'échantillonnage, pour dériver les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des médicaments hydrolysés en périphérie et/ou dans la biophase. De plus, les concentrations dans les compartiments périphérique et effet, prédites à partir d'une analyse compartimentale basée sur des prélèvements artériels, surestiment les concentrations mesurées dans le liquide interstitiel musculaire et le liquide céphalorachidien. Ceci illustre clairement les limites de l'approche compartimentale avec ou sans élimination périphérique.

En appliquant aux concentrations prédites un facteur de correction tenant compte du pourcentage d'extraction tissulaire, de la liaison aux protéines plasmatiques et du coefficient de partage cellulaire dans le cas du liquide céphalorachidien, nous avons démontré qu'il était possible d'estimer exactement les concentrations réelles dans le compartiment périphérique et dans la biophase. Ceci implique que la concentration efficace produisant 50% de l'effet ( $EC_{50}$ ) devrait être corrigée pour des médicaments soumis à une élimination dans la biophase. D'autre part, d'un point de vue pharmacocinétique, il s'agit d'un moyen exact pour estimer les concentrations réelles dans les organes les moins perfusés, remédiant ainsi à la principale limite de l'approche compartimentale avec élimination périphérique.

La réalisation de ce protocole a impliqué le développement au préalable, d'une méthode analytique basée sur la chromatographie liquide couplée à un détecteur ultra-violet pour doser le RMF et son métabolite dans du plasma de chien. En effet, la nature de la matrice d'analyse est primordiale dans la relation pharmacocinétique-pharmacodynamique puisqu'on considère que seule la fraction libre plasmatique diffuse vers la biophase. Or, les méthodes analytiques décrites jusqu'à présent dans la littérature impliquent une matrice sanguine et ne permettent pas le dosage simultané du métabolite. De plus, nous avons exploité un nouveau paramètre en mesurant la puissance de l'activité cérébrale dans la bande de fréquence des ondes thêta pour mesurer la pharmacodynamie de l'opioïde à partir d'un électroencéphalogramme. Enfin, la microdialyse a été utilisée pour échantillonner le

liquide interstitiel dans le muscle gracilis et gastrocnemius pendant l'administration du RMF chez l'animal. Compte tenu de l'hydrolyse du RMF dans le tissu musculaire, une nouvelle méthode pour la calibration des sondes de microdialyse *in vivo* a été proposée.

**Mots-clés :** *réfifentanol, microdialyse, électroencéphalogramme, pharmacocinétique, pharmacodynamie, extraction tissulaire*

## Abstract

Remifentanyl (RMF) is a strong opioid analgesic which belongs to the phenylpiperidine class. It exhibits an ultra short duration of action that enables anesthesiologists to titrate the effect during the surgical procedure without compromising the patient's recovery. Its short effect comes from rapid cleavage of its ester bond by tissue esterases, generating the acid metabolite demethoxy-RMF. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of drugs displaying a traditional pharmacokinetic profile often states that the pharmacological effect is driven by arterial concentrations. Moreover, from a pharmacokinetic standpoint, drug administration and sampling site should be the same for an accurate estimation of clearance, central and steady state volumes of distribution. The objective of this thesis was to verify these assumptions for a drug like RMF undergoing tissue extraction in the biophase and the peripheral compartment. The effect compartment concentrations of the opioid derived from arterial sampling were compared to measured cerebrospinal fluid concentration under steady state conditions. Furthermore, RMF peripheral compartment concentrations derived on the basis of arterial sampling were compared to muscle interstitial fluid concentrations using microdialysis. The importance of sampling site for the determination of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters was also assessed. The *in vivo* experiment was initiated with a pharmacokinetic-pharmacodynamic study involving measurement of electroencephalogram in anesthetized dogs after two short infusions of RMF. Two hours later, the dogs received a one-hour infusion of RMF. At steady state, samples were withdrawn simultaneously from femoral vein and artery, jugular vein, muscular interstitial fluids and cerebrospinal fluid.

Our results indicate that RMF undergoes significant extraction from muscle (37%) and brain (34%). For both organs, the venous femoral and jugular concentrations approximated those found in the muscle interstitial fluid and cerebrospinal fluid. This reveals the importance of sampling site for the estimation of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of drugs undergoing peripheral or biophase elimination. It was also found that the peripheral and effect compartment concentrations predicted from the compartmental

analysis overestimated those measured in the muscle interstitial fluid and CSF. These findings highlight the limitations of the compartmental approach with or without peripheral elimination.

We were able to estimate the real concentrations in the peripheral and biophase compartment by applying a correction factor to the predicted concentration that took into account tissue extraction, plasma protein binding and cell partition coefficient for the CSF. This implies that the  $EC_{50}$  value should be properly corrected for drugs extracted in the biophase such as RMF. In addition, the proposed correction factor allows an accurate estimation of peripheral compartment concentrations in compartmental modeling and bypasses the major limit of this approach when peripheral elimination occurs.

In order to achieve the *in vivo* part of this work, an HPLC-based assay coupled to ultra-violet spectrometry detection was set up to quantify simultaneously RMF and its major metabolite in dog plasma. Indeed, in pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis only plasma concentrations are considered to reach the receptors. All the analytical methods proposed in the literature were based on whole blood and did not allow the simultaneous determination of both RMF and its metabolite concentrations. Moreover, we used a new pharmacodynamic parameter, based on the absolute theta power to measure RMF-induced brain activity in pentobarbital-anesthetized dogs. For peripheral sampling, a microdialysis procedure was developed to monitor RMF and demethoxy-RMF in the interstitial fluid of gracilis and gastonecmius muscles. A new method for *in vivo* probe calibration was introduced to take into account RMF hydrolysis occurring in the muscle.

**Keywords :** *remifentanyl, microdialysis, electroencephalogram, pharmacokinetics, pharmacodynamics, tissue extraction*



## Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche le Professeur France Varin, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire ainsi que pour sa surprenante vision scientifique qui confère à sa recherche toute son originalité.

Je remercie mon co-directeur de recherche le Professeur Pascal Vachon pour l'expertise qu'il a apportée dans le domaine de l'électroencéphalographie ainsi que pour son enthousiasme communicatif et son attitude positive qui m'ont laissé entrevoir la lueur au bout du chemin.

Je remercie les membres de mon Jury, le Dr Jacques Somma et le Dr Pierre Beaulieu pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à la correction de ce travail. Je les remercie pour les commentaires et les suggestions qu'ils y ont apposés comme les dernières retouches d'un peintre à une toile inachevée. Je remercie le Dr Line Labbé, Présidente du Jury, pour la coordination de l'ensemble du processus d'évaluation.

Je remercie le Professeur Nobuharu Yamaguchi et Sanae Yamaguchi pour avoir si gentiment mis à notre disposition leur espace de laboratoire et pour leur généreuse assistance lors des essais *in vivo*.

Je remercie Johanne Couture pour m'avoir enseigné la discipline et la rigueur qu'exige le travail de laboratoire. Mais surtout, merci Johanne pour l'ambiance amicale que tu créais au sein du laboratoire et qui faisait en sorte qu'on n'y comptait pas nos heures. S'il m'arrive d'être nostalgique de mes années de thèse c'est en repensant à nos savoureuses discussions, nos échanges sur un livre un article paru ou un nouveau film, nos fous rires et nos larmes. Mille merci pour ces moments précieux.

Je remercie mes collègues de labo, Julie et Samia pour leurs conseils et leur complicité qu'on saura j'espère préserver.



Je remercie les compagnies de recherche pharmaceutique du Canada pour la bourse d'étude qu'ils m'ont octroyée durant deux années.

Je remercie ma famille et tout particulièrement ma sœur, Selma que j'ai négligée lors de son trop court passage à Montréal, j'étais si préoccupée par ma recherche, merci de ne jamais me l'avoir reproché.

Enfin, je te remercie Jean-Christophe pour avoir été à l'écoute de mes tourmentes nocturnes d'apprenti chercheur. Merci pour avoir toujours cru en moi bien plus que je n'y croyais moi-même. Il est évident que mon expérience en recherche je te la dois entièrement. Tu m'as non seulement fait découvrir cet univers mais tu m'y as initiée et guidée d'une façon si naturelle et si passionnée. Malgré les doutes concernant les choix de carrière que j'ai pu faire, grâce à toi, je regarde aujourd'hui mon parcours avec fierté. Mais ma plus grande fierté demeure celle de partager ma vie avec toi, en espérant pouvoir te redonner un jour l'attention et le soutien que tu as su m'apporter tout au long de mon cheminement en recherche. Le défi est de taille!





*"flower of joy"*

*À ma mère Badéa,  
À mon père Mohamed,*



*Douter de tout ou tout croire,  
ce sont les deux solutions également commodes  
qui l'une et l'autre nous dispensent de réfléchir.  
Henri Poincaré, La Science et l'hypothèse.*



## Table des matières

Liste des tableaux .....	xix
Liste des figures .....	xxi
Liste des abréviations.....	xxiv
Avant-propos .....	xxvii
<b>CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>2</b>
1.1 Historique des opioïdes dans la pratique anesthésique .....	2
1.2 Quel était l'intérêt de développer un nouvel opioïde? .....	3
<b>2. Rémifentanyl .....</b>	<b>5</b>
2.1. Propriétés physicochimiques et relation structure-activité .....	5
2.2. Site d'action: récepteurs opioïdes .....	7
2.2.1. Rappel sur la physiologie de la douleur .....	7
2.2.1.1. Stimulus nociceptif .....	7
2.2.1.2. Neuromédiateurs de la corne dorsale .....	8
2.2.1.3. Voies ascendantes de la douleur .....	10
2.2.1.4. Contrôle de la douleur.....	12
2.2.2. Activité <i>in vitro</i> du RMF.....	16
2.2.3. Mécanisme d'action central des opioïdes .....	17
2.2.4. Mécanisme d'action spinal des opioïdes.....	18
2.2.5. Mécanisme d'action périphérique des opioïdes .....	19
2.2.6. Mécanisme cellulaire .....	19
2.3. Méthodes analytiques.....	20
2.4. Pharmacodynamie .....	20
2.4.1. Puissance, installation et récupération de l'effet.....	20
2.4.2. Effets cardio-vasculaires et respiratoires .....	25
2.4.3. Effets au niveau du système nerveux central .....	26
2.4.4. Effets sur le diamètre pupillaire .....	27
2.5. Pharmacocinétique .....	27



2.6. Statut actuel du RMF .....	30
2.7. Effets secondaires.....	32
<b>3. Microdialyse.....</b>	<b>34</b>
3.1. Principes de la microdialyse.....	34
3.2. Aspects méthodologiques de la microdialyse .....	35
3.2.1. Sondes et tubulures .....	35
3.2.2. Composition, pH et température du perfusat .....	36
3.2.3. Considérations analytiques .....	37
3.3. Intégrité du tissu.....	37
3.4. Récupération à travers la membrane .....	38
3.4.1. Récupération <i>in vitro</i> .....	39
3.4.2. Récupération <i>in vivo</i> .....	40
3.4.3. Quelques méthodes pour déterminer la récupération <i>in vivo</i> : quantification des données de microdialyse .....	40
3.4.3.1. Méthode du «no-net-flux» .....	40
3.4.3.2. Dialyse avec standard interne et rétrodialyse ou dialyse inverse.....	41
3.5. Études pharmacocinétiques utilisant la microdialyse .....	43
3.5.1. Pharmacocinétique dans le cerveau .....	44
3.5.2. Pharmacocinétique dans les tissus périphériques.....	46
3.5.3. Études chez l'Homme .....	47
<b>4. Électroencéphalographie.....</b>	<b>49</b>
4.1. Bases physiologiques de l'électroencéphalographie.....	49
4.1.1. Origines de l'activité cérébrale .....	50
4.1.2. Sources du signal EEG.....	51
4.1.3. Polarité et amplitude des ondes EEG .....	53
4.2. Appareillage .....	55
4.2.1. Électrodes.....	55
4.2.2. Amplificateurs.....	56
4.3. Interprétation du signal EEG.....	57
4.3.1. Analyse visuelle .....	57

4.3.2. Analyse automatique.....	58
4.4. Caractéristiques des tracés EEG chez le chien.....	62
4.4.1. États normaux de conscience .....	62
4.4.2. Effets des opioïdes sur le tracé EEG .....	63
4.5. EEG et quantification de l'effet narcotique .....	65
<b>5. Modélisation PK-PD .....</b>	<b>67</b>
5.1. Analyse pharmacocinétique .....	67
5.1.1. Modèles non compartimentaux .....	68
5.1.2. Modèles compartimentaux ou déterministes.....	68
5.1.2.1. Modèle monocompartimental .....	69
5.1.2.2. Modèle bicompartimental, résolution après une perfusion.....	69
5.1.2.3. Équations généralisées pour les 3 types de modèles bicompartimentaux...	72
5.1.2.4. Concept d'élimination périphérique.....	76
5.1.3. Modèles physiologiques.....	77
5.2. Analyse de la relation dose-effet.....	78
5.2.1. Modèles pharmacodynamiques.....	79
5.2.1.1. Effet fixe.....	79
5.2.1.2. Modèle $E_{\max}$ .....	80
5.2.1.3. Modèle linéaire.....	80
5.2.1.4. Modèle sigmoïde $E_{\max}$ .....	80
5.2.1.5. Modèle Log-linéaire.....	81
5.2.2. Analyse PK-PD .....	82
5.2.2.1. Modèle PK-PD paramétrique.....	82
5.2.2.2. Modèle PK-PD semi-paramétrique et non-paramétrique.....	84
<b>6. Objectifs .....</b>	<b>85</b>
<b>CHAPITRE 2: MANUSCRITS .....</b>	<b>86</b>
<b>1. Simultaneous solid-phase extraction combined to HPLC with UV detection for the determination of remifentanil and its metabolite in dog plasma [Journal of Chromatography B 783: 103-111 (2002)] .....</b>	<b>87</b>
1.1. Abstract .....	88

1.2. Introduction .....	89
1.3. Experimental .....	91
1.3.1. Materials.....	91
1.3.2. Instrumentation .....	91
1.3.3. Mobile phase .....	92
1.3.4. Standard solutions .....	92
1.3.5. Remifentanil <i>ex vivo</i> stability in blood.....	92
1.3.6. Calibration curves .....	93
1.3.7. Extraction procedure .....	93
1.3.8. Assay validation .....	94
1.3.8.1. Recovery .....	94
1.3.8.2. Linearity and limit of quantitation .....	95
1.3.8.3. Reproducibility.....	95
1.3.8.4. Statistical analysis .....	96
1.3.9. Pharmacokinetic study .....	96
1.4. Results and discussion .....	97
1.5. Conclusion .....	101
1.6. Reference list.....	102
1.7. Figure legend.....	103
<b>2. Impact of peripheral elimination on the concentration-effect relation of remifentanil in anaesthetized dogs [<i>British Journal of anaesthesia</i>, 94 (3): 357-365 (2005)].....</b>	<b>111</b>
2.1. Abstract .....	112
2.2. Introduction .....	113
2.3. Materials and methods .....	115
2.3.1. Chemicals.....	115
2.3.2. Animal preparation.....	115
2.3.2.1. Animals .....	115
2.3.2.2. Implantation of electrodes and recording.....	116
2.3.2.3. Animal surgery.....	116

2.3.2.4. Protein binding.....	116
2.3.3. Pharmacodynamic period.....	117
2.3.4. Washout period .....	117
2.3.5. Steady state period .....	118
2.3.5.1. Arterio-venous gradient .....	118
2.3.5.2. Cerebrospinal fluid samples.....	118
2.3.6. Pharmacokinetic period.....	118
2.3.7. Red blood cell / plasma partition coefficient .....	119
2.3.8. Sample analysis.....	119
2.3.9. Data analysis .....	120
2.3.9.1. Pharmacodynamic analysis .....	120
2.3.9.2. Pharmacokinetic analysis .....	120
2.3.9.3. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling.....	121
2.3.9.4. Arterio-venous gradient .....	121
2.3.9.5. Effect compartment concentration .....	122
2.4. Results .....	123
2.5. Discussion .....	125
2.6. Conclusion .....	130
2.7. Reference List .....	131
2.8. Figure legend.....	135
<b>3. Impact of the peripheral elimination on the muscle interstitial concentrations of remifentanyl in anaesthetized dogs: a proposed correction factor [British Journal of anaesthesia].....</b>	<b>144</b>
3.1. Abstract .....	145
3.2. Introduction .....	146
3.3. Materials and methods .....	147
3.3.1. Chemicals.....	147
3.3.2. Microdialysis system.....	147
3.3.3. <i>In vitro</i> calibration study .....	147
3.3.3.1. Relative recovery of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl .....	148

3.3.3.2. Relative loss of demethoxy-remifentanyl .....	148
3.3.3.3. Delay for equilibrium.....	149
3.3.4. Animal preparation.....	149
3.3.4.1. Animals .....	149
3.3.4.2. Animal surgery.....	149
3.3.4.3. Microdialysis probe implantation .....	150
3.3.4.4. <i>In vitro</i> protein binding .....	150
3.3.5. <i>In vivo</i> probe calibration: reference period .....	151
3.3.6. PK-PD study .....	151
3.3.7. Washout period .....	151
3.3.8. Steady state period .....	151
3.3.8.1. Microdialysis sampling .....	152
3.3.8.2. Arterio-venous gradient .....	152
3.3.9. Pharmacokinetic period.....	152
3.3.10. Sample analysis.....	152
3.3.11. Data analysis .....	153
3.3.11.1. Retrodialysis by metabolite.....	153
3.3.11.2. Arterio-venous gradient .....	154
3.3.11.3. Pharmacokinetic analysis.....	154
3.3.11.4. Peripheral compartment concentration .....	155
3.4. Results .....	156
3.5. Discussion .....	158
3.6. Conclusion .....	163
3.7. Reference list.....	164
3.8. Figure legend.....	167
<b>CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>176</b>
<b>1. Études <i>in vitro</i> .....</b>	<b>178</b>
1.1. Métabolisme du RMF <i>in vitro</i> .....	178
1.2. Stabilité <i>ex vivo</i> du RMF dans le sang complet .....	179
1.3. Coefficient de partage globules rouges-plasma .....	180



<b>2. Méthodologies.....</b>	<b>180</b>
2.1. Bio-analyse.....	180
2.2. Microdialyse.....	182
2.3. Mesures pharmacodynamiques .....	185
2.3.1. Pupillométrie .....	185
2.3.2. Analyse spectrale de l'électroencéphalogramme .....	185
2.4. Modélisation pharmacocinétique .....	187
<b>3. Étude <i>in vivo</i> .....</b>	<b>188</b>
3.1. Protocole et résultats expérimentaux .....	188
3.2. Influence de l'extraction tissulaire sur les paramètres PK-PD du RMF .....	189
3.3. Influence de l'extraction musculaire sur les paramètres pharmacocinétiques du RMF .....	191
<b>4. Conclusion générale .....</b>	<b>196</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>199</b>
<b>ANNEXE I Électroencéphalogrammes : tracés bruts</b>	
<b>ANNEXE II Discrimination entre les modèles pharmacocinétiques</b>	
<b>ANNEXE III Modélisation Pharmacocinétique</b>	
<b>ANNEXE IV Modélisation Pharmacodynamique</b>	
<b>ANNEXE V Statistiques Descriptives et Erreur Standard liée aux Paramètres PK et PD</b>	





## Liste des tableaux

### CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1. Comparaison des propriétés physico-chimiques du fentanyl et de ses dérivés ...	7
Tableau 2. Puissance relative des dérivés du fentanyl évaluée selon des paramètres cliniques .....	22
Tableau 3. Comparaison des paramètres PK-PD du fentanyl et de ses dérivés .....	24
Tableau 4. Paramètres PK du fentanyl et de ses dérivés chez l'Homme .....	29

### CHAPITRE 2 : PREMIER MANUSCRIT

Table 1. Stability of remifentanil (1000 ng.mL <sup>-1</sup> ) added to fresh dog blood containing citric acid (5 mg.mL <sup>-1</sup> ) and/or echothiophate (40 µg.mL <sup>-1</sup> ) .....	104
Table 2. Recovery of remifentanil and demethoxy-remifentanil from dog plasma .....	105
Table 3. Intra-assay and inter-assay precision and accuracy of remifentanil and demethoxy-remifentanil .....	106
Table 4. Remifentanil and demethoxy-remifentanil curve parameters summary .....	107

### CHAPITRE 2 : DEUXIÈME MANUSCRIT

Table 1. Physiological parameters at baseline and during remifentanil steady state conditions in pentobarbital anaesthetized dogs .....	136
Table 2. Remifentanil pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters in pentobarbital anaesthetized dogs .....	137
Table 3. Remifentanil pharmacokinetic parameters in pentobarbital anaesthetized dogs .	138
Table 4. Comparison of arterial, venous, cerebrospinal fluid concentrations of remifentanil with those derived for the effect compartment under steady state conditions in anaesthetized dogs .....	139



## CHAPITRE 2 : TROISIÈME MANUSCRIT

Table 1. <i>In vitro</i> relative recovery and relative loss of remifentanil and demethoxy remifentanil over the microdialysis membrane.....	168
Table 2. <i>In vivo</i> relative loss of demethoxy-remifentanil in pentobarbital anaesthetized dogs .....	169
Table 3. Physiological parameters at baseline and during remifentanil steady state conditions in pentobarbital anaesthetized dogs.....	170
Table 4. Exit-site independent pharmacokinetic parameters of remifentanil in pentobarbital anaesthetized dogs.....	171
Table 5. Exit-site dependent pharmacokinetic parameters of remifentanil in pentobarbital anaesthetized dogs .....	172
Table 6. Comparison of measured arterial, venous and interstitial fluid concentrations to derived peripheral concentrations of remifentanil under steady state conditions in anaesthetized dogs.....	173

## CHAPITRE 3 : DISCUSSION

Tableau 1. Temps de demi-vie du RMF incubé à 37°C dans différents milieux .....	179
---	-----



## Liste des figures

### CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Structures chimiques du fentanyl, du sufentanil, de l'alfentanil et du rémifentanyl	6
Figure 2. Réponses périphériques à un stimulus nociceptif .....	8
Figure 3. Voies ascendantes de la douleur .....	11
Figure 4. Contrôles segmentaires de la douleur .....	12
Figure 5. Voies descendantes de la douleur .....	14
Figure 6. Schéma général du contrôle inhibiteur médullaire et supramédullaire de la douleur .....	15
Figure 7. Homologie des récepteurs opioïdes $\mu$ , $\delta$ et $\kappa$ .....	16
Figure 8. Mécanisme d'action central des opioïdes .....	18
Figure 9. Mécanisme d'action spinal des opioïdes .....	18
Figure 10. Sites d'action des opioïdes.....	19
Figure 11. Demi-vie contextuelle des morphiniques .....	28
Figure 12. Principe de la microdialyse <i>in vivo</i> .....	34
Figure 13. Formes courantes des sondes de microdialyse .....	35
Figure 14. Méthode du «no-net-flux» .....	41
Figure 15. Méthode de la rétrodialyse avec le médicament.....	42
Figure 16. Méthode de la rétrodialyse combinée .....	43
Figure 17. a) Représentation d'un neurone et de ses connexions. b) Synapse .....	51
Figure 18. a) Propagation d'un influx nerveux. b) Courants transmembranaires générés par un potentiel d'action .....	52
Figure 19. a) Cellules pyramidales; b) Cellules étoilées .....	52
Figure 20. Configuration quadripolaire associée au courant propagé par un potentiel d'action.....	53
Figure 21. Alignement des cellules pyramidales et potentiel de surface induit par l'activité neuronale .....	54
Figure 22. a) Montage bipolaire. b) Montages combinés, bipolaire et référentiel .....	56



Figure 23. Comparaison schématique de l'analyse de Fourier et de l'analyse apériodique	60
Figure 24. États des EEG induits par l'alfentanil et le fentanyl .....	64
Figure 25. Les trois modèles pharmacocinétiques possibles à deux compartiments .....	72
Figure 26. Représentation schématique de la PK (a), de la PD (b), de la relation dose-effet (c) et du PK-PD (d) .....	79

## CHAPITRE 2: PREMIER MANUSCRIT

Figure 1. The metabolic pathways of remifentanyl are illustrated. Remifentanyl is metabolized by ester hydrolysis, primarily to GI90291. Structure of GI97559, internal standard in HPLC assay. Reproduced with permission .....	108
Figure 2. Representative chromatograms of dog plasma extracts. (A) Drug-free dog plasma sample, (B) calibration standard 1000 ng.mL <sup>-1</sup> , (C) and (D) dog plasma collected from pentobarbital anesthetized dog before bolus administration (C), and 5 min after the injection of an intravenous bolus of 4.4 mg.kg <sup>-1</sup> of remifentanyl chloride (D). ....	109
Figure 3. Plasma concentration-time profiles of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl after a bolus dose of 4.4 mg.kg <sup>-1</sup> of remifentanyl chloride in an anesthetized dog. ...	110

## CHAPITRE 2: DEUXIÈME MANUSCRIT

Figure 1. <i>In vivo</i> experimental protocol in pentobarbital anaesthetized dogs receiving different regimens of remifentanyl. ....	140
Figure 2. Raw data representing (A) the percentage of the maximal observed absolute power calculated in the theta band (% E <sub>max</sub> ) and (B) the plasma concentration time profile of remifentanyl in pentobarbital anaesthetized dogs. ....	141
Figure 3. Observed (○) and predicted (—) absolute power in the theta band during two consecutive 5-min infusion of remifentanyl in pentobarbital anaesthetized dog #4...	142
Figure 4. Plasma concentration-time profile of remifentanyl in a pentobarbital anaesthetized dog (#4). Markers represent the unbound arterial (●), venous (○) and cerebrospinal fluid (■) concentrations. Lines represent the predicted unbound arterial (—) concentrations and effect compartment (---) concentrations corrected for the unbound fraction, brain extraction and tissue partition coefficient.....	143



## CHAPITRE 2: TROISIÈME MANUSCRIT

- Figure 1. *In vivo* experimental protocol in pentobarbital anaesthetized dogs receiving different regimens of remifentanyl. .... 174
- Figure 2. Plasma concentration-time profile of remifentanyl in a pentobarbital anaesthetized dog (#2). Markers represent the unbound arterial (●), venous (■) and muscle interstitial fluid (○) concentrations. Lines represent the predicted unbound arterial (—) concentrations and peripheral compartment (---) concentrations corrected for the unbound fraction and muscle extraction. .... 175

## Liste des abréviations

$\alpha$	Constante hybride de distribution
$\beta$	Constante hybride d'élimination
$\gamma$	Facteur de sigmoïdité
A et B	Intersections des phases de distribution et d'élimination avec l'axe des ordonnées après un bolus
AIC	Critère d'Akaike
AUC	Aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps
BIS	Idexe bispectral
$C_p$	Concentration plasmatique
$C_2$	Concentration dans le compartiment périphérique
CAM	Concentration alvéolaire minimale
$C_e$	Concentration dans le compartiment effet
Cl	Clairance
$C_{LEC,u}$	Concentration libre dans le liquide extracellulaire
D	Dose de charge
E	Effet
$E_1$	Somme des constantes de vitesse de transfert sortant du compartiment central
$E_2$	Somme des constantes de vitesse sortant du compartiment périphérique
$EC_{50}$	Concentration efficace produisant 50% de l'effet
EEG	Électroencéphalogramme
$E_{max}$	Effet maximal
FFT	Transformée de Fourier rapide
$I_v$	Intraveineux
$k_0$	Vitesse de perfusion



$k_{10}$	Constante de vitesse d'élimination du compartiment central
$k_{12}$	Constante de vitesse de transfert du compartiment 1 vers le compartiment 2
$k_{1e}$	Constante de vitesse de transfert du compartiment 1 vers le compartiment effet
$k_{20}$	Constante de vitesse d'élimination du compartiment périphérique
$k_{21}$	Constante de vitesse de transfert du compartiment 2 vers le compartiment 1
$k_{e0}$	Constante de vitesse d'élimination du compartiment effet
$k_{in\ vitro}$	Constante de vitesse d'élimination <i>in vitro</i>
$K_p$	Coefficient de partage octanol-eau
LECC	Liquide extracellulaire cérébral
N	Nombre de compartiments dans un modèle déterministe
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
PD	Pharmacodynamique
PK	Pharmacocinétique
PK-PD	Modélisation pharmacocinétique-pharmacodynamique
PR	Perte relative
R et S	Intersections des phases de distribution et d'élimination avec l'axe des ordonnées à l'arrêt de la perfusion
RMF	Rémifentanyl
RR	Récupération relative
RVM	Région rostro-ventro-médiale
S	Pente de la droite dans un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique linéaire
T	Temps total de la perfusion
$t'$	Temps après l'arrêt de la perfusion
$t_{1/2\ k_{e0}}$	Demi-temps d'équilibre entre les compartiments central et effet
$t_{1/2\ vie}$	Temps de demi-vie d'élimination
TRM	Temps de résidence moyen

UV	Ultra-violet
$V_{d\beta}$	Volume de distribution à l'équilibre de pseudo-distribution
$V_1$	Volume central de distribution
$V_2$	Volume de distribution périphérique
$V_{d_{ss}}$	Volume de distribution à l'équilibre
$X_0$	Dose totale reçue
$X_2$	Quantité de médicament dans le compartiment périphérique
Z	Nombre maximal de constantes de vitesse résolubles dans un modèle déterministe



## Avant-propos

Le travail de recherche qui fait l'objet de cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un vaste projet visant à étudier l'impact de l'élimination périphérique sur l'équilibre de distribution de médicaments nouvellement apparus en anesthésie. En effet, on assiste de plus en plus à l'émergence de molécules dont la durée et l'installation d'action sont extrêmement courtes afin de favoriser la récupération rapide des patients sous anesthésie générale. Citons en exemple le mivacurium et le rémifentanyl (RMF). D'un point de vue métabolique, ces drogues ont la particularité de subir une hydrolyse enzymatique et/ou chimique se produisant aussi bien dans le compartiment central qu'en périphérie dans les organes moins perfusés. Il en résulte un gradient artério-veineux qui indique un changement des concentrations tissulaires. Par conséquent, les modèles pharmacocinétiques (PK) traditionnels qui assument une élimination exclusive à partir du compartiment central ne sont plus adaptés pour décrire adéquatement le devenir de ces médicaments dans l'organisme et l'évaluation de certains paramètres tels que le volume de distribution à l'équilibre ( $V_{d_{ss}}$ ), la clairance intercompartimentale (CI) et le temps de résidence moyen (TRM) sont biaisés. Les modèles tenant compte de l'élimination périphérique, permettent de corriger ces valeurs. Cependant, des travaux antérieurs ont révélé que la prédiction des concentrations périphériques du médicament demeure inchangée quelle que soit la valeur attribuée à la constante d'élimination périphérique  $k_{20}$ <sup>1</sup>. Cet aspect constitue la principale faiblesse de ces modèles.

Le RMF est un opioïde dont la durée d'action extrêmement courte permet aux anesthésiologistes de titrer l'effet analgésique au cours de l'intervention sans craindre de prolonger la récupération des patients. Il subit une hydrolyse par les estérases tissulaires essentiellement au niveau du muscle, de l'intestin et du cerveau, bien que ce dernier ne contribue que faiblement à la clairance totale (CI). L'extraction tissulaire par le foie et le rein est minime et leur clairance représente moins de 2% de la clairance systémique.



L'hydrolyse génère le métabolite acide nommé déméthoxy-RMF qui ne possède aucune action pharmacologique. Il existe également une voie métabolique mineure impliquant la N-déalkylation de la molécule mère.

Ce travail de recherche vise à étudier l'équilibre de distribution des médicaments soumis à une élimination périphérique et à en évaluer l'impact, tant au niveau pharmacocinétique que pharmacodynamique (PD), en utilisant le RMF comme molécule modèle. La présentation de cette thèse débute par une revue de littérature qui introduit le RMF, les principales méthodologies employées, ainsi que les différentes approches de modélisation pharmacocinétique et pharmacodynamique. Une seconde partie comprend les trois manuscrits issus des travaux de recherche. Enfin, une discussion des principaux résultats scientifiques s'articulera autour de trois thèmes principaux, le métabolisme et la stabilité du RMF *in vitro*, la mise au point méthodologique, ainsi que l'impact de l'extraction tissulaire sur l'estimation des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du RMF.



**CHAPITRE 1**  
**REVUE DE LITTÉRATURE**

## 1. Introduction

### 1.1 Historique des opioïdes dans la pratique anesthésique

L'opium est l'un des agents pharmacologiques le plus anciennement connu pour ses effets psychologiques et son action anti-diarrhéique. En effet, 4000 ans avant notre ère, les Sumériens connaissaient déjà les effets psychologiques du jus desséché de certains pavots et au troisième siècle avant J.-C., l'historien grec, Théophraste, en parle dans ses ouvrages (opium en grec signifie jus). La médecine arabe de la fin du premier millénaire reconnut l'action anti-diarrhéique de l'opium et l'on attribue au médecin bâlois, Paracelse, son introduction dans la pharmacopée occidentale au début du XVI<sup>e</sup> siècle. Il fallut attendre le développement de la chimie analytique, au XIX<sup>e</sup> siècle, pour que le jeune apprenti pharmacien allemand, Sertürner, parvienne à isoler à partir de l'opium une substance cristalline qu'il appela morphine, du grec Μορφειος, Dieu du sommeil. C'est ainsi qu'en 1806, la morphine fut le premier alcaloïde isolé à l'état pur. Aujourd'hui, on connaît plus de vingt alcaloïdes extraits de l'opium. À cette époque, la morphine était fréquemment injectée par voie intramusculaire comme prémédication, également comme complément des anesthésies à l'éther ou au chloroforme ou en analgésie postopératoire. Vers la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, de fortes doses de morphine (1 à 2 mg/kg) associée à la scopolamine furent administrées comme anesthésique unique <sup>2</sup>. Mais cette technique tomba rapidement en désuétude du fait de l'augmentation de la morbidité et de la mortalité opératoire <sup>3</sup>. Dans les 30 à 40 années qui suivirent, les anesthésiologistes firent rarement appel en peropératoire aux morphiniques. En 1939, Eisleb et Schaumann obtinrent un dérivé de la phénylpipéridine, la péthidine, dix fois moins puissante que la morphine. Depuis, le développement de dérivés morphiniques semi-synthétiques et synthétiques dépourvus d'effets secondaires, d'une part, et la popularisation du concept de l'anesthésie balancée <sup>4</sup>, d'autre part, ont entraîné un regain d'intérêt pour les morphiniques. L'anesthésie balancée repose sur le fait que chaque composé administré est employé pour un rôle spécifique, tel que l'analgésie, la perte de conscience et l'amnésie, le relâchement musculaire et l'abolition des réflexes autonomes. Cette approche assure une moindre dépression du système cardio-



vasculaire ainsi qu'une reprise plus rapide de la conscience après l'anesthésie. Des modifications de la péthidine ont par la suite, mené à la synthèse du fentanyl, un analgésique puissant, utilisé comme élément de l'anesthésie balancée <sup>5</sup>, en complément d'un anesthésique volatil <sup>6</sup> et également comme anesthésique principal ou unique <sup>7</sup>. Malheureusement, de fortes doses de fentanyl entraînent une importante dépression respiratoire <sup>7</sup> ce qui en limite l'indication aux patients bien portants lors d'interventions de routine. Son succès clinique encouragea néanmoins les chimistes et les pharmacologues à développer de nouveaux analogues offrant des avantages importants. Ainsi, le sufentanil, 5 à 10 fois plus puissant et l'alfentanil, caractérisé par une durée d'action encore plus courte, ont été introduits dans la pratique clinique.

## 1.2 Quel était l'intérêt de développer un nouvel opioïde?

Aujourd'hui, les opioïdes font partie intégrante de l'arsenal thérapeutique des anesthésiologistes. Lors des anesthésies balancées, ils permettent de réduire les doses d'anesthésiques (inhalés ou injectés par voie *iv*), procurent une stabilité cardiovasculaire, atténuent les stimulations du système sympathique lors des interventions chirurgicales et assurent une analgésie postopératoire. Cependant, la toxicité de ces molécules compromet leur utilisation aux doses analgésiques optimales. De plus, leur variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique permet difficilement aux cliniciens d'estimer la dose efficace tolérée. En effet, le fentanyl et ses analogues sont rapidement distribués dans l'organisme où ils subissent une biotransformation hépatique plus lente. Les deux processus influencent la clairance de ces molécules, mais leur contribution relative dépend de la dose, du mode d'administration (perfusion continue ou bolus intermittents) et de la durée de la perfusion. Par conséquent, le volume de distribution et le temps de demi-vie d'élimination du fentanyl et de ses dérivés, déterminés après un bolus, ne permettent pas aux cliniciens de prédire le temps de récupération à la suite de bolus ou de perfusions multiples. Enfin, les variations interindividuelles de facteurs tels que le volume de distribution, la clairance



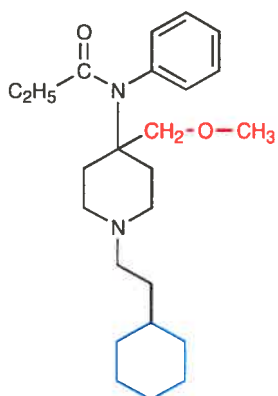
métabolique et la sensibilité aux opioïdes rendent l'ajustement posologique de ces agents difficilement prévisible pour fournir à la fois une analgésie adéquate durant l'opération et un temps de récupération acceptable. Ainsi, d'un point de vue pharmacodynamique, il s'agissait d'augmenter la puissance des nouveaux opioïdes, tout en réduisant ou en limitant les effets secondaires. Alors que d'un point de vue pharmacocinétique, on recherchait des effets pharmacologiques prévisibles et titrables au cours de la chirurgie. Le RMF est le dernier-né des opioïdes synthétiques, résultant de ce double défi. Aujourd'hui, nous ne sommes qu'au début de la compréhension de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie de ces nouvelles molécules d'action ultracourte. De plus, parmi les progrès les plus récents en anesthésie, il faut noter l'avènement des systèmes informatisés reliés aux pompes d'infusion pour contrôler l'administration des médicaments. Il semble dès lors fondamental que des études pharmacocinétiques-pharmacodynamiques (PK-PD) approfondies soient menées en vue d'optimiser l'administration des nouvelles drogues chez chaque patient et d'exploiter entièrement leur potentiel en pratique clinique. Mon travail de recherche s'inscrit dans cet objectif et pour le mettre en perspective, nous introduirons dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques du RMF. Un deuxième volet décrira les méthodologies auxquelles nous avons eu recours, incluant la microdialyse pour estimer la distribution tissulaire et l'électroencéphalographie pour mesurer l'activité opioïde. En effet, bien que le RMF soit avant tout un analgésique, le choix du EEG comme paramètre pharmacodynamique s'est imposé en raison des conditions expérimentales (animal anesthésié). Enfin, le dernier chapitre traitera de la modélisation mathématique des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques.



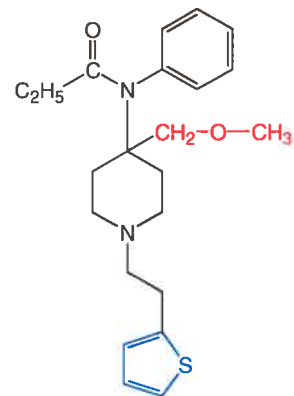
## 2. Rémifentanyl

### 2.1. Propriétés physicochimiques et relation structure-activité

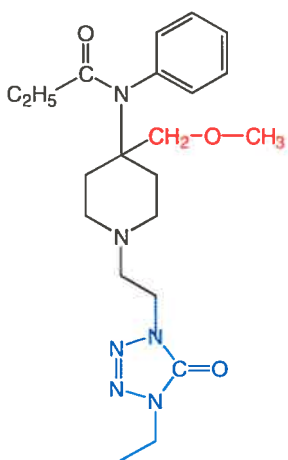
Le RMF est le sel du méthyl ester 3-[4-méthoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)phénylamino]-1-pipéridine] acide propanoïque. Le chlorure du RMF a une masse moléculaire de 412.9 g/mol. Il appartient à la famille des 4-anilidopipéridines comprenant le fentanyl, l'alfentanyl et le sufentanyl. Les structures de ces molécules et leurs propriétés physico-chimiques sont représentées dans la figure et le tableau 1. Le défi des chercheurs était de développer un opioïde à la fois puissant et de courte durée d'action. Leur stratégie consista à remplacer le groupement aryl sur le squelette 4-anilido-pipéridine par un groupement lipophile conservant une bonne affinité pour le récepteur  $\mu$ , mais dont l'hydrolyse enzymatique conduirait à un groupement plus polaire sans aucune activité agoniste. C'est ainsi que l'incorporation d'un ester méthylique à la fonction N-acyl est la structure de base conférant au RMF ses caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques uniques.



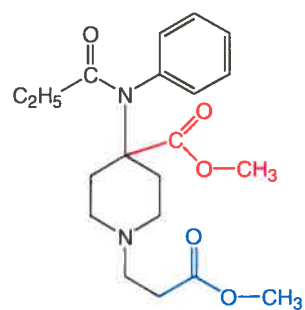
Fentanyl



Sufentanil



Alfentanil



Rémifentanil

Figure 1. Structures chimiques du fentanyl, du sufentanil, de l'alfentanil et du rémifentanil



Tableau 1. Comparaison des propriétés physico-chimiques du fentanyl et de ses dérivés <sup>8</sup>

Opiïdes	Kp octanol/eau	pKa	Fraction non ionisée dans le plasma %	Fraction libre dans le plasma %
Fentanyl	813	8.4	9	16
Sufentanil	1778	8.0	20	8
Alfentanil	129	6.5	89	8
Rémifentanil	18	7.1	67	8

## 2.2. Site d'action: récepteurs opioïdes

### 2.2.1. Rappel sur la physiologie de la douleur <sup>9</sup>

#### 2.2.1.1. Stimulus nociceptif

Les récepteurs périphériques du message nociceptif et le premier neurone sont représentés par les terminaisons libres des fibres sensibles A $\delta$  à conduction rapide et des fibres C à conduction lente. En plus d'une stimulation directe, celles-ci sont activées par les médiateurs chimiques de la réaction inflammatoire (bradykinine, sérotonine, histamine, ions potassium et hydrogène). La substance P est un peptide de 11 acides aminés qui participe à la vasodilatation. Elle est libérée en périphérie par l'influx nerveux qui se propage non seulement vers la moelle épinière mais aussi de façon antidromique, vers les autres terminaisons libres de la même fibre. Il en résulte une dégranulation des mastocytes libérant de l'histamine (Fig. 2).

SP : substance P  
 HIS : histamine  
 5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine)

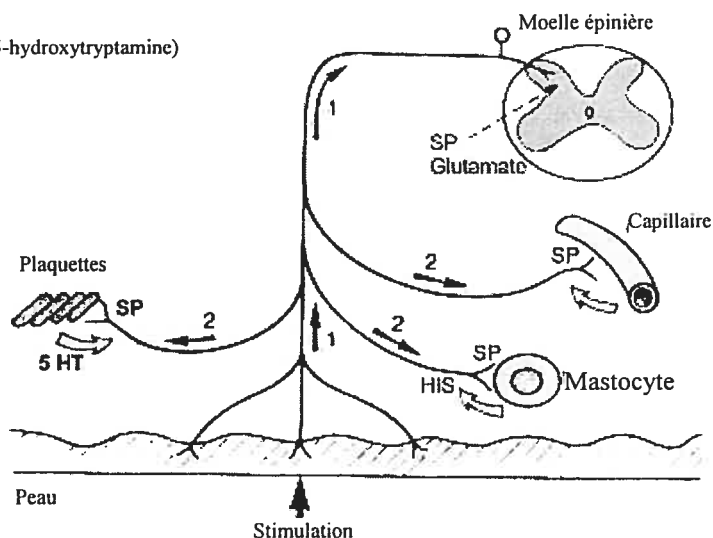


Figure 2. Réponses périphériques à un stimulus nociceptif<sup>10</sup>

### 2.2.1.2. Neuromédiateurs de la corne dorsale

#### Acides aminés excitateurs

La corne postérieure de la moelle épinière est riche en récepteurs du glutamate particulièrement dans les couches superficielles. Il existe deux familles principales: les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques.

Les récepteurs ionotropiques, couplés à un canal ionique, sont subdivisés selon leurs ligands:

- N-méthyl-D-aspartate (NMDA ;  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ )
- alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxalone propionate (AMPA)
- kaïnate et au 2-amino-4-phosphonobutyrate (AP4)

Les récepteurs "métabotropiques" sont liés à une protéine G couplée à l'adénylate cyclase.

### Peptides

Le plus étudié est la substance P, essentiellement concentrée dans les couches les plus superficielles (I et II) de la corne postérieure où se terminent les fibres afférentes nociceptives. Elle se comporte comme un neuromédiateur excitateur au niveau des terminaisons des fibres afférentes fines.

Le CGRP (Calcitonin gene-related peptide) dérive du même gène que celui de la calcitonine. Sa libération lors de stimulations nociceptives potentialise les effets excitateurs de la substance P.

De nombreux autres peptides sont libérés lors de stimulations nociceptives (somatostatine, cholécystokinine, neuropeptide FF, neurokinine A, neurotensine, peptide intestinal vasoactif, arginine-vasopressine, ocytocine, peptide libérant de la gastrine, galanine, angiotensine II, hormone corticotrope, dynorphine, enképhalines).

### Opiïdes endogènes

Les  $\beta$ -endorphines ( $\mu$ ), l'endomorphine-1 et l'endomorphine-2, les enképhalines ( $\delta$ ), les dynorphines ( $\kappa$ ) et l'orphanine FQ / nociceptine (ORL<sub>1</sub>) agissent sur des récepteurs opioïdes très représentés dans certaines zones du cerveau, mais également au niveau de la corne dorsale.



### 2.2.1.3. Voies ascendantes de la douleur<sup>11</sup>

#### Voie ascendante spinale

Empruntant les nerfs périphériques sensitifs, la majeure partie des fibres afférentes primaires gagne la moelle épinière par les racines rachidiennes postérieures. Elles se répartissent sur plusieurs segments dans la substance blanche dorso-latérale pour se terminer dans les couches I à V de la corne dorsale. Les fibres périphériques font synapse avec les motoneurones constituant ainsi un arc réflexe.

#### Voie ascendante supraspinale (Fig. 3)

Les fibres nociceptives croisent la ligne médiane au niveau des commissures grises et rejoignent le quadrant antéro-latéral controlatéral pour former les faisceaux spinoréticulaires et spinothalamiques. Ceux-ci se projettent principalement vers 3 sites:

- la formation réticulée
- le mésencéphale
- le thalamus latéral

Au niveau supraspinal, les voies thalamo-corticales ont deux destinations principales :

- Un contingent latéral vers le cortex somatosensoriel primaire (S1) et secondaire (S2)
- un contingent médian vers les cortex cingulaire antérieur, insulaire et frontal, correspondant à la composante affective de la sensation douloureuse.

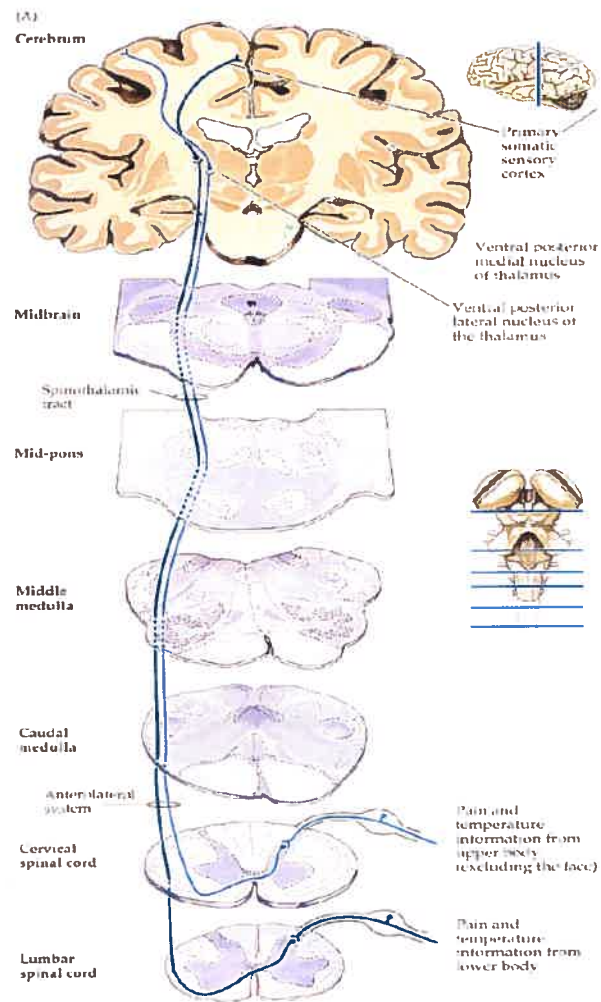


Figure 3. Voies ascendantes de la douleur<sup>12</sup>

### 2.2.1.4. Contrôle de la douleur<sup>11</sup>

#### Contrôles segmentaires: corne postérieure de la moelle épinière

Plusieurs hypothèses ont été proposées au sujet du réseau de neurones intramédullaires responsable du contrôle inhibiteur de la douleur. La plus simple stipule que les afférences A $\alpha$  et A $\beta$  de la sensibilité générale se terminent sur des interneurones inhibiteurs qui, ainsi excités, inhibent l'activité des neurones convergents et par conséquent s'opposent à la transmission des messages douloureux (Fig. 4).

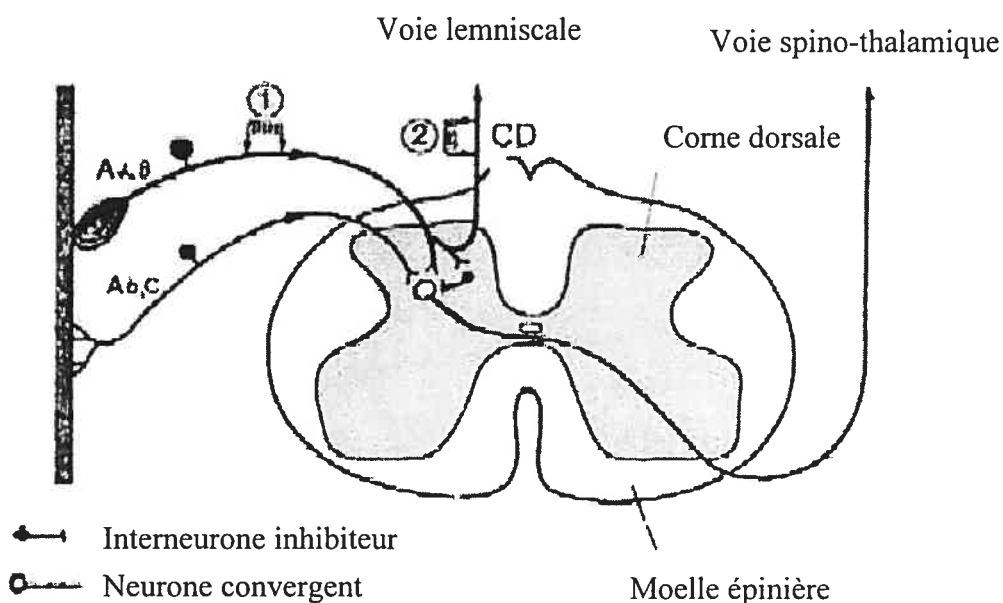


Figure 4. Contrôles segmentaires de la douleur<sup>10</sup>

### Contrôles médullaires d'origine supraspinale (Fig. 5)

Expérimentalement chez l'animal, la stimulation électrique du tronc cérébral (principalement la substance grise périaqueducale -SGPA- et le noyau raphé magnus -NRM-) induit une puissante analgésie. Le noyau raphé magnus projette massivement sur la corne dorsale en empruntant le funiculus dorsolatéral de la moelle. L'aire parabrachiale, le locus ceruleus et l'hypothalamus envoient aussi des projections descendantes vers la moelle. La sérotonine et la noradrénaline sont les principaux neurotransmetteurs de ces voies.

L'intervention de neurones ayant pour neurotransmetteur un opioïde endogène (telle que les enképhalines, la  $\beta$ -endorphine et la dynorphine) a également été mise en évidence.

D'un point de vue anatomique, les projections spinales directes à partir de la substance grise périaqueducale sont rares et l'on admet que cette région exerce principalement son action par l'intermédiaire du noyau raphé.

### Contrôles inhibiteurs déclenchés par des stimulations nociceptives (CIDN)

Il a été démontré que les neurones à convergence de la corne dorsale peuvent être inhibés lorsqu'un stimulus nociceptif est appliqué en dehors de leur champ récepteur périphérique. Ce phénomène est désigné par le terme "contrôles inhibiteurs diffus induits par stimulation nociceptive" ou CIDN. Les noyaux du raphé feraient partie de la boucle de rétroaction négative mise en jeu par des stimulations nociceptives intenses. Ils entraîneraient en retour l'inhibition de la transmission des messages nociceptifs au niveau médullaire. La puissance de l'inhibition observée est directement liée à l'intensité des stimuli nociceptifs diffus.



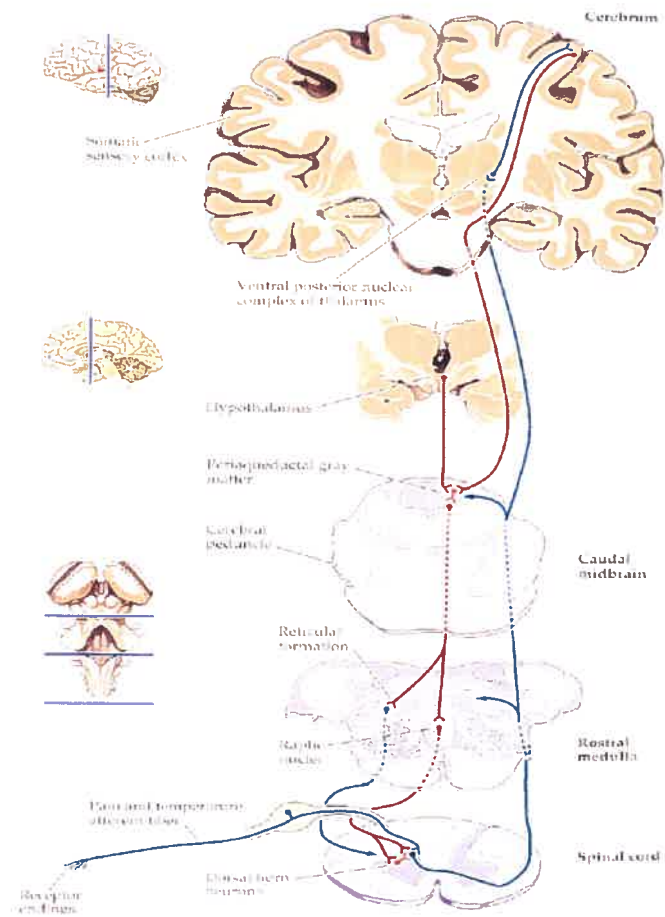


Figure 5. Voies descendantes de la douleur<sup>12</sup>



Les voies ascendantes et descendantes du contrôle de la douleur sont résumées à la figure 6.

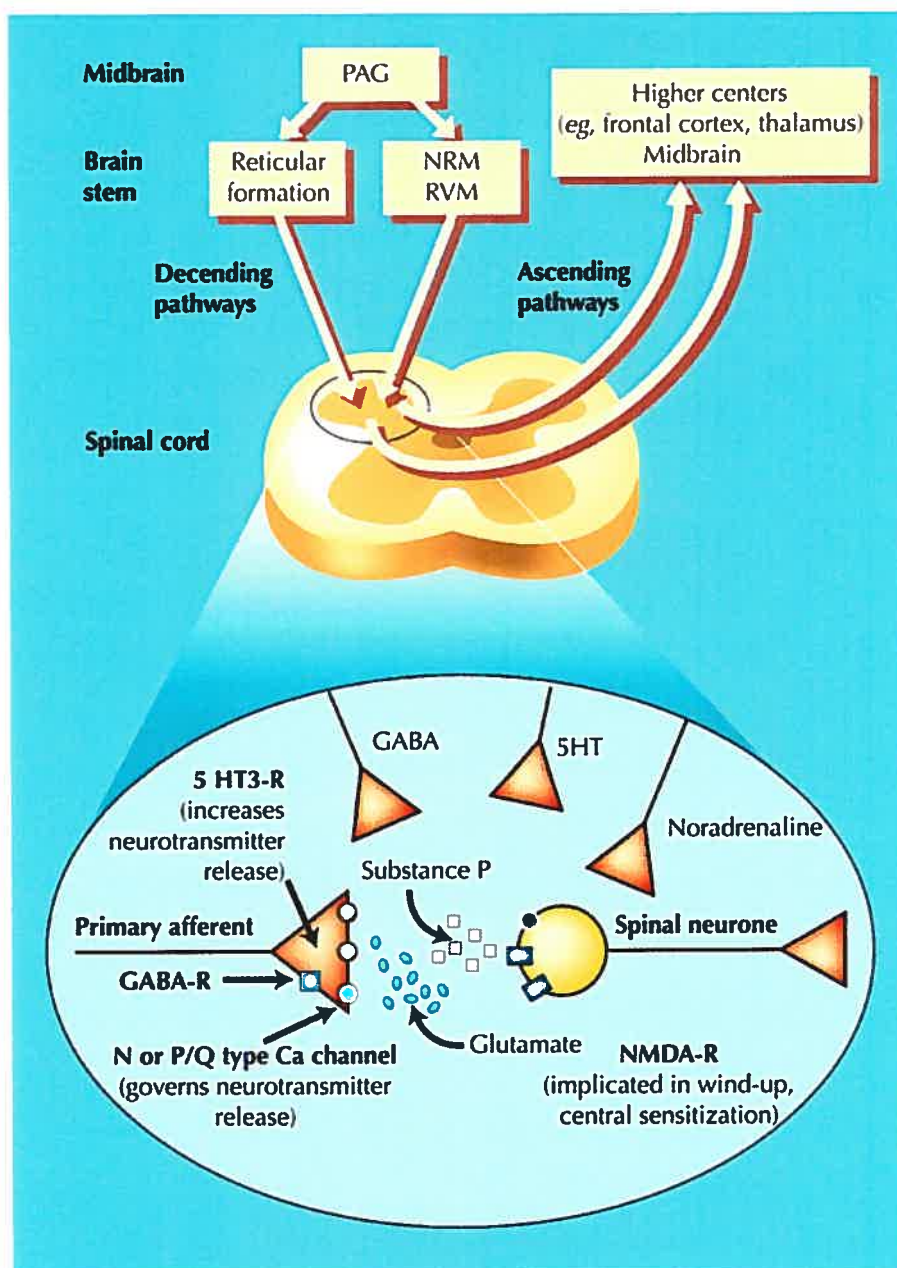


Figure 6. Schéma général du contrôle inhibiteur médullaire et supramédullaire de la douleur <sup>12</sup>. Note : Les voies enképhalinergiques seront discutées plus spécifiquement aux paragraphes 2.2.3 et 2.2.4.

### 2.2.2. Activité *in vitro* du RMF

Les propriétés agonistes du RMF pour les récepteurs opioïdes furent d'abord démontrées *in vitro* <sup>13</sup>. Le RMF est capable d'inhiber les contractions de l'iléon du cobaye et du canal déférent de la souris et du rat, induites par une stimulation électrique <sup>13</sup>. Ces trois tissus isolés sont communément utilisés comme modèle pour démontrer l'activité opioïde. Ces études révèlent également la forte affinité du RMF pour le récepteur opioïde  $\mu$ , prépondérant dans l'analgésie et la dépression respiratoire <sup>13</sup>. Trois principaux types de récepteurs opioïdes sont aujourd'hui identifiés, les récepteurs  $\mu$ ,  $\kappa$ , et  $\delta$  (Fig. 7), dont l'activation déterminent les actions particulières de chaque opioïde. Ainsi, l'activation du récepteur  $\mu$  est principalement responsable de l'analgésie supraspinale, la dépression respiratoire, l'euphorie et du phénomène de dépendance. L'activation du récepteur  $\kappa$  entraîne la sédation, l'analgésie spinale et le myosis. Enfin, l'activation du récepteur  $\delta$  est associée à l'analgésie spinale et supraspinale et à la libération de l'hormone de croissance. Les trois types de récepteurs sont couplés aux protéines G (essentiellement Gi/Go) qui inhibent l'adénylate cyclase conduisant à une diminution de la transmission synaptique (cf. 2.2.6).

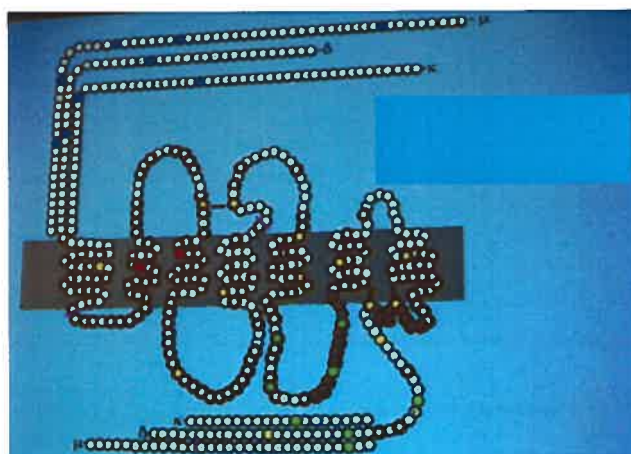


Figure 7. Homologie des récepteurs opioïdes  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$

### 2.2.3. Mécanisme d'action central des opioïdes

D'un point de vue anatomique les récepteurs morphiniques sont situés dans de nombreuses parties du SNC, comprenant le cortex cérébral, le cortex limbique, l'hypothalamus, le thalamus médian, le tronc cérébral (substance grise périaqueducule), la zone extrapyramidale, la substance gélatineuse et les neurones sympathiques préganglionnaires.

Le système limbique du cerveau antérieur (cortex cingulaire antérieur, certaines régions corticales frontales, l'hypothalamus et le noyau central de l'amygdale) projette au niveau de la substance grise périaqueducule du mésencéphale. Les effets opioïdes au niveau de la substance grise périaqueducule influencent, par le biais de connexions neuronales directes, la région rostro-ventro-médiale (RVM) du bulbe et exercent un contrôle qui peut à la fois inhiber ou faciliter la transmission nociceptive. À son tour la RVM module la transmission nociceptive des neurones de la corne dorsale de la moelle. Les neurones de la région RVM sont au moins de deux types: les cellules «on» et les cellules «off». Les morphiniques inhibent l'activité des cellules «on» qui bloquent normalement les cellules «off» par le biais d'une transmission d'interneurones GABA<sub>A</sub>ergiques. Les cellules «off» deviennent alors actives et inhibent à leur tour la transmission nociceptive (Fig. 8). En revanche, les agonistes des récepteurs opioïdes  $\kappa$  et ORL1 (« opioid receptor-like ») qui agissent dans la région RVM du bulbe peuvent réduire l'analgésie en inhibant les cellules «off» ou encore bloquer l'hyperalgésie en inhibant les cellules «on». L'action de ces agonistes contrecarre l'état du circuit selon que celui-ci se trouve en mode analgésique ou hyperalgésique, s'opposant par le fait même à l'action des morphiniques. L'état analgésique résulterait donc d'un subtil équilibre entre système antinociceptif et pronociceptif. Des évidences de plus en plus marquantes laissent croire que l'état « on » ou « off » du circuit serait conditionné par des états motivationnels d'aversion ou d'appétence <sup>14</sup>.



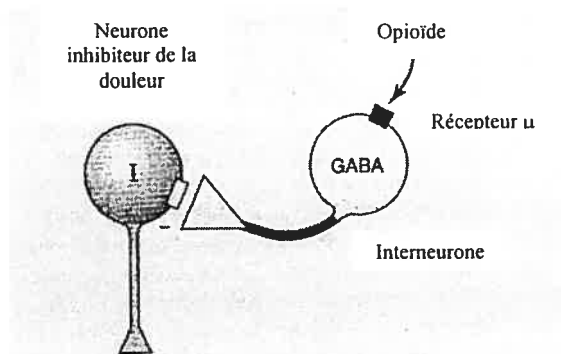


Figure 8. Mécanisme d'action central des opioïdes

#### 2.2.4. Mécanisme d'action spinal des opioïdes

Outre l'inhibition descendante, les morphiniques agissent au niveau des synapses nerveuses soit au niveau présynaptique (comme neuromodulateurs) ou postsynaptique (comme neurotransmetteurs) (Fig. 9). La substance gélatineuse de la moelle possède une forte densité de récepteurs opioïdes. La libération présynaptique de substance P au niveau des neurones sensitifs primaires de la moelle épinière est inhibée par les agonistes  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  et se révèle l'un des mécanismes de l'analgésie morphinique au niveau du névraxe <sup>15</sup> Les morphiniques inhibent l'excitation de la corne dorsale en réponse à des stimulations douloureuses aiguës véhiculées par les fibres A $\delta$  ainsi que la sommation des potentiels postsynaptiques excitateurs transmis par les fibres C (mécanisme postsynaptique, douleur sourde et persistante).

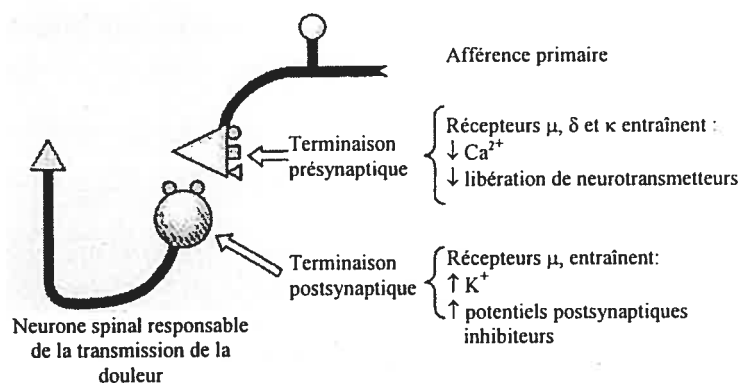


Figure 9. Mécanisme d'action spinal des opioïdes

### 2.2.5. Mécanisme d'action périphérique des opioïdes

Les morphiniques peuvent aussi produire une certaine analgésie par le biais de mécanismes périphériques <sup>16</sup>. Ils inhibent les décharges électriques des nocicepteurs en périphérie. Des facteurs modifiant leur efficacité, comme l'inflammation, sont potentiellement indispensables pour le succès de telles approches thérapeutiques <sup>16</sup>.

### 2.2.6. Mécanisme cellulaire <sup>17</sup>

La fixation des morphiniques aux récepteurs  $\mu$  entraîne l'inhibition de l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de la protéine G. La diminution de l'adénosine monophosphate cyclique intracellulaire augmente la conductance potassique et inhibe l'ouverture des canaux calciques. Il en résulte une hyperpolarisation de la membrane neuronale et une diminution de la transmission synaptique.

Les voies enképhalinergiques sont représentées à la figure 10.

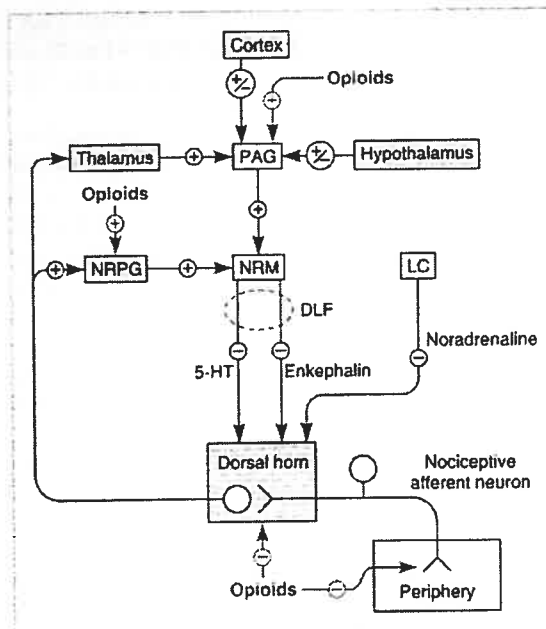


Figure 10. Sites d'action des opioïdes

### 2.3. Méthodes analytiques

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées pour doser le RMF et/ou son métabolite. Ces méthodes sont basées sur des extractions liquides du principe actif à partir du sang entier. Les échantillons sont immédiatement stabilisés en acidifiant <sup>18</sup> ou en précipitant les protéines du sang avec de l'acétonitrile <sup>19</sup> pour inhiber l'activité estérasique. Une seule méthode publiée emploie une extraction sur phase solide mais elle ne permet pas d'obtenir simultanément le RMF et son métabolite <sup>20</sup>. L'identification des extraits se fait par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse <sup>19,21</sup>, la chromatographie en phase liquide <sup>18,22</sup> ainsi que la spectrométrie de masse en tandem <sup>23</sup>. La sensibilité des méthodes chromatographiques en phase liquide couplées à un détecteur ultra-violet est comprise entre 10 et 60135 ng/mL chez le chien <sup>18</sup>, 1 et 200 ng/mL chez l'Homme <sup>18</sup> et 2.5 et 250 ng/mL chez le rat <sup>22</sup>. Les méthodes en spectrométrie de masse, sont quant à elles beaucoup plus sensibles pour doser le RMF (limite de quantification inférieure 0.1 ng/mL) <sup>19,21,23</sup> et son métabolite (limite de quantification inférieure 1 ng/mL) <sup>21</sup>. Une méthode analytique basée sur une procédure d'extraction sur phase solide et sur la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV a été développée dans le cadre de ce projet afin de doser simultanément le RMF et son métabolite dans une matrice plasmatique chez le chien <sup>24</sup>.

### 2.4. Pharmacodynamie

#### 2.4.1. Puissance, installation et récupération de l'effet

Tous les agonistes des récepteurs  $\mu$  possèdent des effets pharmacologiques similaires. Par conséquent, décrire leur pharmacodynamie revient souvent à déterminer leur puissance relative. Les modèles expérimentaux de douleur chez l'animal sont basés sur l'observation du comportement et utilisent des stimuli de forte intensité de nature thermique, mécanique ou chimique <sup>25</sup>. Les tests évaluent la douleur aiguë (stimulation



thermique de la queue ou pression exercée sur la patte), tonique (injection de formaline ou de formaldéhyde intradermal) et chronique (injection de l'adjuvant de Freund ou de la capsaïcine). Il existe également des modèles expérimentaux pour évaluer les douleurs neuropathiques centrales et périphériques comme l'allodynie tactile et l'hyperalgésie thermique (lésion du nerf périphérique sciatique ou de la moelle épinière, injection de vincristine). Chez l'Homme, les modèles développés pour évaluer la douleur aiguë <sup>26</sup>, tonique <sup>27</sup>, inflammatoire <sup>28</sup> et neuropathique <sup>29</sup>, reposent sur des stimulations de la même nature (immersion glace-eau, lésion causée par le froid, rayons UV-B ou encore administration d'agents chimiques tels que la capsaïcine). Idéalement, la puissance d'un opioïde devrait être évaluée selon ses propriétés analgésiques. Cependant, la notion de douleur étant subjective, on utilise des paramètres cliniques indirects, comme la capacité d'induire la perte de conscience <sup>30</sup>, de prévenir les mouvements à l'incision de la peau <sup>31</sup>, de réduire la concentration alvéolaire minimale d'anesthésiques volatils <sup>32</sup> ou de provoquer un certain degré de dépression respiratoire <sup>33</sup>. Une méthode statistique de régression logistique permet de définir les concentrations plasmatiques ou sanguines produisant 50% de l'effet maximal. Même si ces dernières varient selon le paramètre pharmacodynamique mesuré, la puissance relative des opioïdes n'est pas affectée.

Le degré d'analgésie produit par le RMF et l'alfentanil dépend de la dose administrée <sup>33</sup>. Les études de pharmacodynamie chez l'Homme, basées sur un modèle expérimental pour évaluer la douleur <sup>33</sup> ou sur l'induction de la perte de conscience (incapacité de répondre à trois commandes) <sup>30</sup> démontrent que le RMF est 19 à 30 fois plus puissant que l'alfentanil. Les concentrations dans le sang total produisant 50% de l'effet maximal selon ces deux types de monitoring de l'effet, sont décrites dans le tableau 2. Après un bolus, la durée de l'effet analgésique des deux opioïdes est identique bien que le temps de demi-vie de l'alfentanil soit beaucoup plus long <sup>33</sup>. À la fin d'une perfusion de RMF, la récupération de la fonction respiratoire s'effectue spontanément après 5 à 15 min indépendamment de la dose reçue, du fait qu'il ne s'accumule pas, alors que la dépression

induite par l'alfentanil se dissipe beaucoup plus lentement (30 à 60 min) à des doses équilibreffices<sup>31,33-35</sup>.

La CAM représente la concentration alvéolaire minimale d'agents anesthésiques volatils nécessaire pour prévenir le mouvement à l'incision de la peau chez 50% des patients<sup>36</sup>. Les opioïdes réduisent la CAM de nombreux anesthésiques volatils, ce qui permet d'estimer leur puissance relative<sup>37,38</sup>. Les études évaluant les concentrations plasmatiques du fentanyl<sup>37,39</sup>, de l'alfentanil<sup>37</sup> et du sufentanil<sup>38</sup> capables de réduire la CAM de l'isoflurane de 50%, démontrent que le RMF (concentration dans le sang complet)<sup>32</sup> est aussi puissant que le fentanyl, 20 fois plus puissant que l'alfentanil et 10 fois moins puissant que le sufentanil (Tableau 2). Néanmoins, même à de fortes doses, il ne réduit pas la CAM de 100%. Comme les autres opioïdes, le RMF ne peut être employé qu'à titre additif conjointement à un agent anesthésique<sup>37,38</sup>. Des résultats semblables ont été obtenus chez le chien, en comparant les concentrations plasmatiques et sanguines minimales produisant une réduction de 50% de la CAM de l'enflurane<sup>40-43</sup> (Tableau 2).

Tableau 2. Puissance relative des dérivés du fentanyl évaluée selon des paramètres cliniques

Mesure PD		Concentrations plasmatiques ou sanguines produisant 50% de l'effet maximal			
		µg/L			
		RMF	Alfentanil	Fentanyl	Sufentanil
Volontaires <sup>33</sup>	Modèle expérimental	4**	-	-	-
Volontaires <sup>30</sup>	Perte de conscience	54**	1012**	-	-
Patients	↓ CAM isoflurane*	1.4** <sup>32</sup>	29** <sup>37</sup>	0.5-1.7* <sup>37,39</sup>	0.14* <sup>38</sup>
Chiens	↓ CAM enflurane*	103** <sup>40</sup>	2613** <sup>41</sup>	97* <sup>42</sup>	51* <sup>43</sup>

\*Concentration plasmatique produisant 50% de l'effet maximal observé

\*\*Concentration dans le sang entier produisant 50% de l'effet maximal observé





Des études PK-PD basées sur le calcul du rebord spectral ont permis de déterminer la puissance absolue du fentanyl et de ses dérivés chez des volontaires sains<sup>44,45</sup>. Le rebord spectral 95%, représente la fréquence en dessous de laquelle se trouve 95% de la puissance de l'activité cérébrale totale (cf. 4.3.2). Ainsi, en comparant la concentration dans le compartiment effet produisant 50% de l'effet maximal ( $EC_{50}$ ), le RMF apparaît 20 fois plus puissant que l'alfentanil, tandis que le fentanyl et le sufentanil sont respectivement 2 et 30 fois plus puissants que le RMF (Tableau 3). Chez des chiens anesthésiés des mesures électroencéphalographique de l'activité dans les bandes de fréquence delta et du rebord spectral après une courte perfusion d'opioïde démontrent que le RMF est environ 8 fois plus puissant que l'alfentanil<sup>20</sup> (Tableau 3).

Outre la  $EC_{50}$ , le demi-temps d'équilibre ( $t_{1/2 k_{e0}}$ ) est également un paramètre PK-PD utile lorsqu'on simule un compartiment effet pour caractériser le délai entre les concentrations dans le compartiment central et celles dans la biophase. Des études chez les volontaires sains démontrent que la réduction du rebord spectral s'installe aussi rapidement après l'administration du RMF, de l'alfentanil ou du sufentanil (Tableau 3)<sup>44,45</sup>.



Tableau 3. Comparaison des paramètres PK-PD du fentanyl et de ses dérivés

	Mesure PD	$t_{1/2}$ $k_{e0}$ min				EC <sub>50</sub> μg/L		
		RMF	Alfentanil	Fentanyl	Sufentanil	RMF	Alfentanil	Fentanyl
Volontaires	EEG : rebord spectral	1.6 ± 0.9 <sup>44</sup>	0.96 ± 0.81 <sup>44</sup>	6.2 ± 2.8 <sup>45</sup>	6.6 ± 1.7 <sup>45</sup>	20 ± 5.2 <sup>44</sup>	376 ± 159 <sup>44</sup>	8.1 ± 2.2 <sup>45</sup>
Chiens <sup>20</sup>	EEG : rebord spectral	5.2 ± 6.4	3.7 ± 2.2	-	-	0.64 ± 0.18	5.00 ± 2.48	-
Chiens <sup>20</sup>	EEG : activité en delta (μV)	2.3 ± 4.8	3.1 ± 1.4	-	-	0.97 ± 0.41	7.70 ± 4.27	-
Rats <sup>46</sup>	EEG : rebord spectral	1.77 ± 0.64	-	-	-	32 ± 12	-	-

Il est nécessaire de noter que les études mentionnées ci-dessus comparent la puissance du RMF et de l'alfentanil à partir d'une analyse dans le sang complet. Cependant, tous les autres opioïdes sont traditionnellement dosés dans le plasma<sup>45,47,48</sup>. Par conséquent, une correction tenant compte du coefficient de partage globules rouges / plasma et de la valeur de l'hématocrite est nécessaire afin d'extrapoler leur puissance à des concentrations sanguines. Ainsi, VanderMeer et ses collaborateurs comparent chez le chien la concentration de RMF dans le sang complet réduisant la CAM de l'enflurane de 50% à celle du fentanyl obtenue lors de précédentes études<sup>40</sup>. Il apparaît alors que le fentanyl est deux fois plus puissant que le RMF. Peu d'études tiennent compte de la différence de matrice pour comparer la puissance des opioïdes. Ces observations renforcent l'intérêt de développer une méthode analytique pour doser le RMF dans le plasma tel que mentionné au chapitre 2.3.

La puissance du principal métabolite, le RMF acide, représente environ 1/4600 fois celle du RMF<sup>20</sup>. Du fait qu'il s'élimine essentiellement par voie urinaire, l'effet opioïde du RMF acide n'acquerrait de l'importance que lors d'une perfusion prolongée chez des patients anéphriques<sup>20</sup>.

#### 2.4.2. Effets cardio-vasculaires et respiratoires

Les effets hémodynamiques du RMF sont similaires à ceux des autres dérivés du fentanyl. Chez le chien, le RMF produit une diminution de la pression artérielle, de la fréquence et du débit cardiaque dépendante de la dose<sup>49</sup>. De la même manière, chez les patients en chirurgie le RMF entraîne une diminution de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle<sup>50</sup>. Contrairement à la morphine, l'hypotension observée avec le RMF n'est pas due à une libération d'histamine<sup>50</sup>. Il existe peu d'information dans la littérature à propos du mécanisme par lequel le RMF diminue la pression artérielle. Des expériences sur la trabécule atriale droite isolée chez l'Homme ne démontre aucun effet inotrope du RMF sur le myocarde<sup>51</sup>. En revanche, il a été démontré que le RMF induisait une vasodilatation



de l'aorte isolée du rat impliquant la libération d'oxyde nitrique et l'inhibition de canaux calciques dépendants du voltage <sup>52</sup>. Chez les personnes âgées, une hypotension profonde peut survenir, on suggère alors une surveillance accrue et un ajustement du dosage <sup>53</sup>. Les changements hémodynamiques peuvent être atténués par une prémédication avec du glycopyrrolate ou en administrant de l'éphédrine <sup>50</sup>.

L'augmentation de la pression partielle en gaz carbonique et la baisse de la pression partielle en oxygène constituent les deux stimuli des centres réglant normalement la respiration automatique. Le RMF induit une dépression respiratoire comparable à celle des autres opioïdes, bien qu'elle soit de plus courte durée. Il réduit la sensibilité des centres respiratoires du tronc cérébral à une augmentation de la pression partielle en gaz carbonique. Le niveau de dépression respiratoire observé chez des patients souffrant d'insuffisance rénale à un stade terminal est semblable à celui observé chez les individus dont la fonction rénale est normale <sup>54</sup>. Les patients qui souffrent d'insuffisance hépatique semblent, quant à eux, plus sensibles <sup>55</sup>. Enfin, la dépression respiratoire induite par le RMF et l'alfentanil peut être renversée par une injection de naloxone <sup>34</sup>.

#### **2.4.3. Effets au niveau du système nerveux central**

Les effets sur le débit sanguin cérébral, la pression intracrânienne et la vitesse du métabolisme cérébral sont similaires à ceux des autres opioïdes. Chez des chiens anesthésiés à l'isoflurane, une perfusion de RMF ou d'alfentanil réduit le flux sanguin cérébral <sup>56</sup>. De la même manière, il semblerait que des doses individuelles de RMF, de fentanyl ou d'alfentanil administrées à des patients anesthésiés ne modifient pas la pression intracrânienne et peuvent, à des doses supérieures, diminuer la pression de perfusion cérébrale parallèlement à une diminution de la pression artérielle moyenne <sup>57,58</sup>. Les effets cérébrovasculaires de l'alfentanil chez les patients demeurent toutefois controversés puisqu'il a aussi été démontré qu'il n'induisait pas un changement significatif de la pression intracrânienne <sup>59</sup>.



Le RMF augmente l'amplitude et diminue la fréquence de l'électroencéphalogramme (EEG) <sup>44</sup>. Il entraîne une diminution caractéristique du rebord spectral, le signal se retrouvant essentiellement dans les bandes de fréquence delta et thêta <sup>44</sup>.

#### **2.4.4. Effets sur le diamètre pupillaire**

Le RMF comme les autres opioïdes provoquent un myosis en activant le noyau parasympathique du nerf oculomoteur. L'exactitude et la maniabilité des nouveaux pupillomètres apparus sur le marché ont relancé l'intérêt d'exploiter le diamètre et la réactivité pupillaire comme un outil de mesure pharmacodynamique pour cette classe de médicament. Larson et ses collègues ont ainsi démontré chez des volontaires anesthésiés à l'isoflurane, que l'alfentanil ne diminue pas le réflexe pupillaire en réponse à un stimulus lumineux, mais qu'en revanche, à une concentration de 100 ng/mL, il inhibe la dilatation pupillaire suivant un stimulus nocicepteur <sup>60</sup>. Une bonne corrélation fut observée entre le diamètre pupillaire et les concentrations plasmatiques de l'alfentanil. Leurs résultats démontrent également que la dilatation pupillaire est plus sensible à une stimulation nociceptrice que les paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque) employés de routine lors des anesthésies à l'isoflurane et au propofol <sup>61</sup>. L'effet d'un stimulus nocicepteur électrique sur le diamètre et la réactivité pupillaire de volontaires sains a également été mis en relation avec les concentrations effet du RMF <sup>62</sup>. De façon similaire, une meilleure corrélation a été obtenue comparativement aux mesures hémodynamiques ou électroencéphalographiques.

#### **2.5. Pharmacocinétique**

Le RMF possède une pharmacocinétique linéaire et sa distribution dans l'organisme peut être représentée par un modèle à deux ou trois compartiments <sup>33,63,64</sup>, bien que sa distribution dans le troisième compartiment soit limitée à moins de 5% de l'exposition



totale<sup>63</sup>. La clairance du RMF est plus rapide que celle de l'alfentanil (2.5 vs 0.5 L/h/kg)<sup>33</sup> du fait d'un petit volume de distribution de 0,39 L/kg et d'une plus courte demi-vie d'élimination ( $t_{1/2 \text{ vie}} = 10$  vs 58 min) (Tableau 4)<sup>33</sup>.

Les paramètres pharmacocinétiques du RMF sont indépendants du mode d'administration. Chez des patients sous chirurgie<sup>64</sup> et des volontaires sains<sup>63</sup>, la clairance totale du RMF est comprise entre 2 et 3 L/h/kg, le volume de distribution à l'équilibre entre 0.34 et 0.57 L/kg et le temps de demi-vie moyen entre 10 et 21 min<sup>63,64</sup>. Afin de prédire le temps de récupération après l'administration d'opioïdes, Glass et ses collaborateurs<sup>33</sup> ont proposé le concept du temps de demi-vie contextuelle qui, contrairement au temps de demi-vie réel, dépend de la durée de la perfusion. Il représente le temps requis pour que les concentrations plasmatiques d'un principe actif déclinent de 50% à la fin d'une perfusion. Contrairement aux autres agonistes des récepteurs  $\mu$ , le temps de demi-vie contextuelle du RMF est indépendant de la durée de la perfusion<sup>33,44,63,64</sup>. En effet, il a été démontré qu'à la fin d'une perfusion de plus de 240 min celui-ci était de 4 min (en général < 3min)<sup>35,63</sup> versus 34 min pour le sufentanil, 58 min pour l'alfentanil et 262 min pour le fentanyl<sup>64</sup> (Fig. 11).

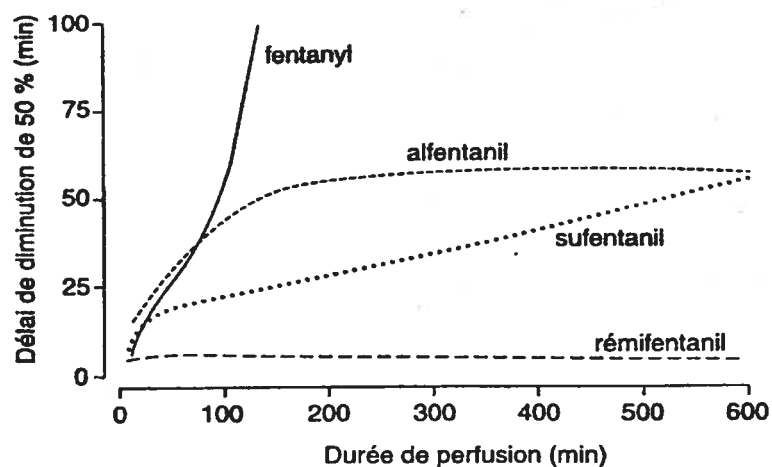


Figure 11. Demi-vie contextuelle des morphiniques<sup>33</sup>

Tableau 4. Paramètres PK du fentanyl et de ses dérivés chez l'Homme

Opioides	V <sub>d<sub>ss</sub></sub> L/kg	Cl mL/min/kg	t <sub>1/2</sub> min
Fentanyl <sup>42</sup>	3-5	10-20	180-300
Sufentanil <sup>41</sup>	2	13	164
Alfentanil <sup>42</sup>	0.25-0.75	3-8	60-120
Rémifentanil <sup>63,64</sup>	0.3-0.4	40-60	8-20

Le RMF n'est pas un substrat des butyrylcholinestérases plasmatiques <sup>65</sup>. Par conséquent, des ajustements de doses ne sont pas requises chez les individus présentant une déficience enzymatique <sup>66</sup>. Le RMF subit une dé-estérification par les estérases érythrocytaires et tissulaires non spécifiques, conduisant au métabolite acide <sup>33,67</sup>. Près de 90% du médicament se retrouve alors dans l'urine sous forme de RMF acide <sup>33</sup>. Le RMF est également N-déalkylé, mais dans une moindre mesure (métabolite GI 94219) <sup>67</sup>. Son métabolisme est sensible à la température corporelle. Durant une hypothermie provoquée lors d'un pontage coronarien (28°C), la clairance du RMF diminue, (2 à 1.5 L/h/kg) et le temps de demi-vie se prolonge (6 à 12 min) sans que le volume central de distribution (V<sub>1</sub>) ne soit affecté <sup>68</sup>. La prolongation du temps de demi-vie s'expliquerait par une réduction de l'hydrolyse enzymatique durant l'hypothermie <sup>69</sup>.

Chez des chiens sous anesthésie, la perfusion de RMF démontre, à l'équilibre, un important gradient artério-veineux à travers le muscle (47%), l'intestin (45%) et le cerveau (24%) <sup>70</sup>. Les clairances tissulaires de ces trois organes représentent 50% de la clairance systémique du RMF tandis que la contribution des clairances hépatique et rénale est inférieure à 8% <sup>70</sup>. En comparaison, l'extraction hépatique de l'alfentanil chez l'Homme est comprise entre 30 et 60% <sup>43</sup>.

Le poids et l'âge influencent la clairance du RMF <sup>53,71,72</sup>. Une étude montre que la clairance (1.9 vs 1.6 L/h/kg) et le volume central de distribution (0.1 vs 0.07 L/kg) sont

plus petits chez des patients présentant une obésité pathologique en raison des altérations physiologiques des systèmes cardio-vasculaire et respiratoire <sup>71</sup>. La dose initiale de RMF doit être basée sur le poids idéal chez ces patients, car la clairance et le volume de distribution du RMF sont en meilleure corrélation avec le poids corporel idéal qu'avec le poids réel chez ces sujets <sup>71</sup>. De plus, chez les enfants, la clairance est plus rapide (5 L/h/kg) et le volume central plus grand (0.45 L/kg) ce qui explique une demie-vie d'élimination inchangée (3-6 min) <sup>72</sup>. Chez les personnes âgées, la clairance du RMF est réduite d'environ 25%. On préconise alors de diminuer les doses initiales de 50% en raison d'une plus grande sensibilité aux effets pharmacologiques des opioïdes <sup>73</sup>. Enfin, la cinétique du RMF n'est pas altérée en cas d'insuffisance hépatique <sup>55</sup> ou rénale <sup>54</sup>. Par conséquent, il n'y a pas d'ajustement de doses à faire chez ces patients, pour qui une anesthésie incluant le RMF serait appropriée. Bien que le temps de demi-vie du RMF acide soit remarquablement prolongé chez les patients souffrant d'insuffisance rénale (27 h vs 1,5 h chez les volontaires sains) des effets pharmacologiques sont improbables puisque le métabolite est très peu actif <sup>54</sup>.

## 2.6. Statut actuel du RMF

Le RMF se différencie des autres agonistes des récepteurs  $\mu$  par son métabolisme indépendant des principaux organes d'élimination. L'hydrolyse par les estérases tissulaires non spécifiques lui confère une installation d'action rapide et prévisible, un titrage facile au cours de l'intervention et une récupération rapide, sans effets cumulatifs, quelle que soit la durée de la perfusion. Un tel profil pharmacodynamique favorise son emploi dans différents types d'anesthésie à la fois pour des courtes interventions, des cas chirurgicaux d'un jour ou des perfusions prolongées.

En anesthésie générale, le RMF est utile lorsqu'on recherche un effet synergique entre les opioïdes et les agents hypnotiques. Le RMF seul n'est en général pas approprié pour induire une anesthésie, mais on l'utilise plutôt en combinaison avec le thiopental ou le propofol <sup>74,75</sup>. Il est surtout indiqué lorsque le niveau de stimulation pendant la chirurgie est





élevé ou variable de par son installation rapide de l'effet. De plus, il permet une meilleure titrabilité des réponses somatiques et hémodynamiques aux stimuli chirurgicaux comparativement à l'alfentanil ou au fentanyl<sup>74,76,77</sup>. Administré conjointement avec le propofol, il atténue également, de manière efficace, les réponses au stress opératoire (intubation trachéale, incision chirurgicale)<sup>31</sup>. Enfin, on peut aussi choisir d'avoir recours au RMF lorsqu'on recherche une analgésie profonde pendant l'opération (fortes concentrations d'opioïdes) sans compromettre pour autant le temps de récupération de l'anesthésie (chirurgie d'un jour). Plusieurs études montrent que la vitesse de récupération est plus rapide après une perfusion de RMF qu'après une perfusion d'alfentanil. Le recours à la naloxone semble aussi moins fréquent (15 à 25% vs 60% pour l'alfentanil) ce qui entraîne une sortie plus rapide de l'unité des soins postanesthésiques<sup>74,78</sup>. Chez les patients en chirurgie ambulatoire, une faible perfusion de RMF permet une respiration spontanée durant l'anesthésie avec l'isoflurane ou le propofol<sup>79</sup>.

Les propriétés analgésiques et sédatives du RMF s'installent rapidement et sont facilement titrables pour engendrer un sentiment de bien-être chez les patients en anesthésie locale et régionale<sup>80</sup>. En effet, lors d'une anesthésie régionale, le RMF procure une sédation équivalente au propofol et une meilleure analgésie offrant une alternative intéressante à ce dernier<sup>81,82</sup>. En combinaison *iv* avec une faible dose de midazolam, il procure une sédation et une analgésie optimales avec une meilleure prévision et un meilleur titrage de l'effet, sans affecter le confort du patient ou la qualité générale de l'analgésie<sup>83,84</sup>.

Les propriétés pharmacocinétiques du RMF facilitent son utilisation chez différents groupes de patients (patients souffrant d'insuffisance hépatique ou rénal, jeunes, vieux, obèses)<sup>53-55,71,72</sup>. En effet, les concentrations à l'équilibre sont facilement prédites du fait que la clairance n'est pas affectée par des variables comme le mode d'administration (bolus vs perfusion), les fonctions hépatiques ou rénales, le sexe ou les interactions médicamenteuses. Les quelques facteurs modifiant la clairance du RMF (âge) et son volume de distribution (poids) n'affectent pas significativement sa durée d'action. De plus,

les estérases non spécifiques responsables du métabolisme du RMF ne semblent pas soumises à un polymorphisme génétique contrairement aux pseudo-cholinestérases plasmatiques <sup>66</sup>.

Les propriétés furtives du RMF posent toutefois le problème de l'analgésie postopératoire. À la fin de la perfusion, l'analgésie résiduelle est faible, ce qui entraîne une perception quasi-immédiate de la douleur. En effet, des patients ayant reçu le RMF nécessitent une analgésie postopératoire (fentanyl) plus rapidement que ceux traités avec l'alfentanil <sup>76</sup>. Par conséquent, il est impératif d'anticiper et d'initier l'analgésie postopératoire avant l'interruption de la chirurgie. Pour ce faire, on administre un analgésique de longue durée d'action ou on continue de perfuser le RMF à un régime plus faible <sup>74,85</sup>, ce dernier procurant une meilleure analgésie postopératoire que la morphine <sup>86</sup>. À cause du risque de dépression respiratoire, les bolus de RMF ne sont pas recommandés <sup>85,87</sup>.

## 2.7. Effets secondaires

Les effets secondaires les plus communs associés au RMF sont caractéristiques de la pharmacologie des agonistes des récepteurs opioïdes  $\mu$ . Aux doses recommandées durant l'induction et/ou la maintenance de l'anesthésie générale, les événements les plus courants comprennent la bradycardie, l'hypotension, la dépression respiratoire (surtout observée en postopératoire) et la rigidité musculaire <sup>73</sup>. D'autres effets secondaires postopératoires ont aussi été rapportés comme le tremblement, les nausées, les vomissements, la fièvre, la dépression respiratoire, le vertige, la perturbation visuelle, le mal de tête et le prurit <sup>73</sup>. Pour la plupart, le profil de tolérance du RMF est semblable à celui des autres opioïdes utilisés en clinique. L'incidence de la dépression respiratoire, des nausées, des vomissements et de la rigidité musculaire est la même qu'avec l'alfentanil <sup>87</sup> ou le fentanyl <sup>88</sup>. Cependant, le profil pharmacocinétique unique du RMF favorise une dissipation plus rapide des effets secondaires à l'arrêt de la perfusion.



Des études récentes ont mis en évidence le développement d'une hyperalgésie associée à la thérapie opioïde aiguë ou chronique, surtout avec des molécules à action courte comme le RMF. L'hyperalgésie est secondaire à un état d'hyperexcitabilité des neurones nociceptifs de la corne dorsale impliquant les récepteurs NMDA. Il a été constaté que la consommation de morphine post-opératoire augmentait chez les patients en chirurgie ayant reçu des fortes doses de fentanyl ou de RMF <sup>89</sup>. Angst et ses collaborateurs ont démontré chez des volontaires sains une hyperalgésie exacerbée à l'arrêt d'une courte perfusion de RMF <sup>29</sup>. Ces observations soulèvent un problème d'envergure et renforcent de toute évidence l'importance d'un dosage optimal des molécules opioïdes dans la prise en charge de la douleur en milieu clinique.

À cause de son installation d'action rapide le RMF ne devrait être administré que par un personnel qualifié, familier avec l'utilisation d'anesthésiques afin de reconnaître et bien gérer les effets secondaires pouvant se produire. Des équipements adéquats pour assurer les fonctions respiratoires et cardio-vasculaires doivent être également à portée de la main.



### 3. Microdialyse

La microdialyse fut d'abord introduite en neurophysiologie pour examiner *in vivo* l'effet de substances endogènes ou médicamenteuses sur la libération des neurotransmetteurs <sup>90</sup>. Depuis une quinzaine d'années seulement, cette technique est appliquée à la pharmacocinétique et particulièrement à l'étude de la distribution et du métabolisme des médicaments <sup>91-94</sup>.

#### 3.1. Principes de la microdialyse

La microdialyse implique l'implantation d'une sonde dont l'extrémité est munie d'une membrane de dialyse. Celle-ci renferme une chambre de diffusion, dans laquelle on perfuse en continu une solution physiologique appelée perfusat. Le gradient de concentration créé avec le milieu interstitiel favorise la diffusion passive de solutés de part et d'autre de la membrane. Par conséquent, le dialysat recueilli reflète la composition du milieu extracellulaire entourant la sonde (Fig. 12) <sup>92</sup>.

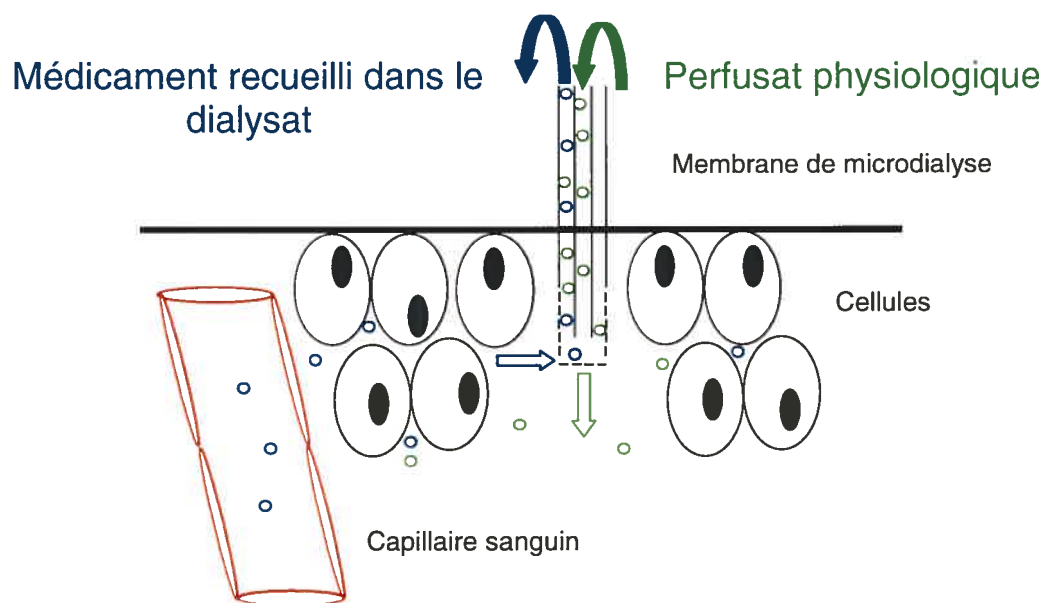


Figure 12. Principe de la microdialyse *in vivo*

## 3.2. Aspects méthodologiques de la microdialyse

### 3.2.1. Sondes et tubulures

Les sondes de microdialyse ont une structure parallèle ou en série et des formes très différentes (Fig. 13)<sup>95</sup>. Les sondes parallèles peuvent être flexibles ou rigides et sont disposées de manière concentrique ou contiguë. Si les sondes intracérébrales sont de préférence rigides pour pouvoir être fixées à la surface du crâne, les sondes flexibles sont plutôt utilisées dans les tissus périphériques mous (muscle, peau, foie), le sang et la bile<sup>95</sup>. Les sondes en série présentent un arrangement linéaire ou en boucle. Celles-ci permettent d'augmenter la surface d'échange et sont typiquement utilisées dans les tissus périphériques<sup>95</sup>. Les sondes décrites ci-dessus sont disponibles dans le commerce mais peuvent aussi être fabriquées de manière artisanale pour répondre à des besoins spécifiques<sup>96-102</sup>, ou pour diminuer le coût de revient.

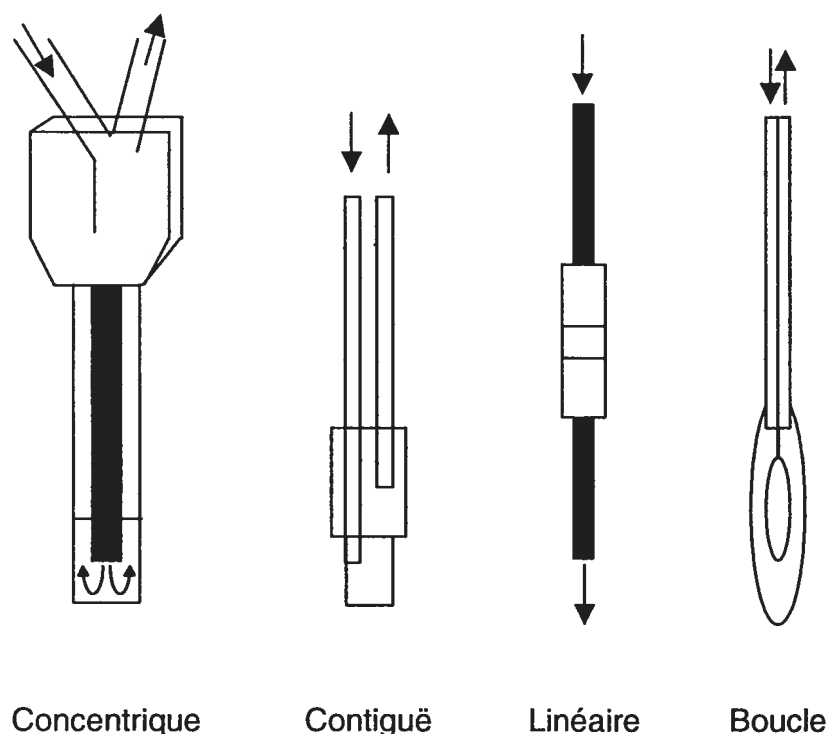


Figure 13. Formes courantes des sondes de microdialyse

La membrane semi-perméable doit être biocompatible, inerte et perméable aux molécules d'intérêt <sup>99,103,104</sup>. Elle est constituée d'un copolymère polycarbonate-éther, de cellulose, de polyacrylonitrile (5 à 30 kD) ou de polyéther sulfone (100 kD). La taille des pores est suffisamment large pour laisser diffuser les solutés tout en empêchant le passage des protéines ou d'autres macromolécules. Les tubulures, par contre, ont une longueur minimale, pour éviter de créer une pression hydrostatique élevée qui endommagerait la membrane, et par le fait même, ses propriétés de dialyse <sup>105</sup>.

### 3.2.2. Composition, pH et température du perfusat

La composition du perfusat doit être semblable à celle du fluide extracellulaire dans le tissu étudié <sup>92,106</sup>. Il doit être iso-osmotique afin de limiter les risques d'altérations du tissu et des molécules endogènes au site de dialyse. En effet, on a montré qu'un changement dans la composition ionique affecte la libération des neurotransmetteurs et augmente la perméabilité de la barrière hématoencéphalique <sup>107-110</sup>. Dans certaines études, des perfusats enrichis en protéines ont été utilisés pour éviter l'adsorption du médicament (surtout des molécules très lipophiles) aux parois des tubulures et à la membrane <sup>111,112</sup>.

Le pH du perfusat doit être identique à celui du liquide extracellulaire dialysé pour éviter de modifier l'homéostasie du tissu. Une modification du pH local est susceptible d'entraîner l'ionisation de la molécule étudiée, une modification de la conformation des protéines impliquées dans la fixation du médicament et une altération des potentiels locaux pouvant modifier la libération locale de molécules endogènes <sup>109</sup>.

Le perfusat est généralement maintenu à température ambiante, ce qui entraîne un gradient de température *in vivo*, pouvant affecter le rendement de la dialyse. Pour contrer ce phénomène, De Lange et ses collaborateurs ont utilisé une canule sous-cutanée dans laquelle le perfusat s'équilibre au préalable à la température corporelle <sup>110</sup>.



Ces études montrent que la température n'affecte pas le rendement de la dialyse dans des tissus sains <sup>110</sup>. Ils recommandent néanmoins de maintenir le perfusat à une température proche de la température corporelle.

### 3.2.3. Considérations analytiques

L'utilisation de la microdialyse est souvent limitée par la performance des techniques analytiques actuellement disponibles. Souvent, il s'agit de mesurer de faibles concentrations de médicaments dans des échantillons de petits volumes. De fait, la méthode analytique choisie doit être sensible et adaptée à des volumes de l'ordre du nL ou du  $\mu\text{L}$  <sup>95</sup>. Les plus courantes comprennent la chromatographie en phase liquide couplée à la détection UV <sup>113,114</sup>, à la fluorescence <sup>97,115</sup>, à l'électrochimie (dosage des amines biogènes) <sup>116-118</sup>, à la spectrométrie de masse <sup>119-122</sup> ou à l'immunoessai (dosage des peptides) <sup>123-125</sup>. Lorsque des méthodes plus sensibles sont nécessaires, on a recours à la chromatographie liquide microbore <sup>126,127</sup> ou à l'électrophorèse capillaire <sup>128-133</sup>. L'absence de protéines dans les dialysats permet de les analyser sans procédure d'extraction préalable, voire dans certains cas de pratiquer une analyse en ligne <sup>95</sup>. Cette technique fut développée afin de minimiser la perte de l'échantillon due au transfert physique et à l'évaporation ainsi que pour l'analyse de molécules instables <sup>114,134-136</sup>. Enfin, on peut augmenter le volume du dialysat en allongeant l'intervalle de prélèvement ou en augmentant le débit de perfusion. Cependant, cette dernière option n'améliore pas forcément la résolution analytique puisqu'elle se fait au dépend du rendement de la dialyse.

### 3.3. Intégrité du tissu

Si petit que puisse être le diamètre des sondes utilisées (300  $\mu\text{m}$  O.D.) <sup>137</sup>, leur insertion crée inévitablement un traumatisme causant des modifications tissulaires au site



de dialyse. Les réactions induites dans le cerveau <sup>138,139</sup> et dans les tissus périphériques ont été étudiées <sup>126,140,141</sup>. On a observé des réactions locales immédiates se manifestant par la libération de substances endogènes d'une part, (formation d'eicosanoïdes dans le cerveau, infiltration des neutrophiles et des macrophages dans la peau) <sup>126,138,140,141</sup> et par un changement du débit sanguin régional d'autre part <sup>139,142</sup>. Par conséquent, un délai d'équilibre après l'implantation de la sonde de dialyse devrait minimiser les éventuels artefacts liés aux dommages tissulaires <sup>110,143</sup>. Par ailleurs, des réactions à plus long terme vis-à-vis du corps étranger ont débuté deux ou trois jours après (réactions gliales dans le cerveau) <sup>139,143-147</sup>. Dans le muscle, des études histologiques ont montré qu'il n'y avait pas de changement dans la composition tissulaire pendant au moins 6 h <sup>126</sup>. Après quoi, l'infiltration des leucocytes commence et se poursuit durant 24 h sans provoquer de modification dans les propriétés de la membrane. Trente heures après l'implantation de la sonde, des scarifications tissulaires ont finalement altéré la diffusion et par conséquent, le rendement de la dialyse <sup>126</sup>.

### 3.4. Récupération à travers la membrane

L'analyse quantitative demeure le point faible de cette technique. Le processus de microdialyse ayant lieu dans des conditions de non-équilibre, la concentration mesurée dans le dialysat ne constitue qu'une fraction de la concentration du médicament dans l'espace interstitiel. Aussi, différentes méthodes ont été proposées pour évaluer le rendement de la dialyse <sup>148-151</sup>. Elles consistent à introduire un facteur de correction pour pouvoir estimer la concentration réelle du médicament dans le milieu extracellulaire.



### 3.4.1. Récupération *in vitro*

S'il n'est plus à démontrer que l'utilisation du rendement *in vitro* ne peut être considérée comme une méthode de référence, l'influence de certains paramètres (ex : débit et composition du perfusé, température, propriétés physico-chimiques de la molécule, caractéristiques de la membrane semi-perméable) sur le taux de récupération doivent néanmoins être étudiés.

La récupération à travers la membrane de dialyse est inversement proportionnelle au débit de perfusion de la sonde, généralement compris entre 0.5 et 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ <sup>92</sup>. En effet, lorsque celui-ci est trop élevé, la surpression créée à l'intérieur de la sonde entraîne la formation d'exsudat qui contrecarre le processus de diffusion. Souvent, on préfère utiliser le plus faible débit possible pour optimiser le taux de récupération. Ainsi, Justice et ses collaborateurs sont parvenus à une récupération quasi-totale (90%) avec un débit de 0.15  $\mu\text{L}/\text{min}$ <sup>152</sup>. Il va de soi que la méthode analytique employée doit être adaptée à de petits volumes d'échantillons (au moins 2  $\mu\text{L}$ ) pour éviter des intervalles de prélèvements trop longs. Par conséquent, le choix du débit de perfusion en microdialyse résulte d'un compromis entre un taux de récupération optimal, un volume et un nombre d'échantillons suffisants pour l'analyse.

Le taux de récupération augmente avec la température<sup>90,153,154</sup>. Ainsi, le rendement de dialyse *in vitro* de l'acide 3,4-dihydrophénylacétique à 23°C a augmenté de 30% lorsque la température a atteint 30°C<sup>153</sup>. De plus, une différence de pression osmotique de part et d'autre de la membrane entraîne un déplacement des molécules d'eau qui influence également la récupération<sup>92</sup>. Enfin, le rendement de dialyse peut être optimisé en augmentant la surface d'échange avec le milieu extracellulaire (diamètre externe 250-500  $\mu\text{m}$ , longueur 1-10 mm)<sup>152,154</sup>. En revanche, la concentration est un paramètre qui n'affecte pas la récupération des médicaments dont le transport s'effectue par diffusion passive<sup>155</sup>.

### 3.4.2. Récupération *in vivo*

La récupération *in vivo* dépend essentiellement de la diffusion du médicament dans l'espace interstitiel. Celle-ci est affectée par l'extraction cellulaire, le métabolisme du médicament, le transport membranaire actif, la vascularisation et le débit sanguin à travers le tissu <sup>92</sup>. À partir de ces variables, un modèle mathématique a été développé pour tenter de prédire la récupération *in vivo* <sup>156</sup>. Les études *in vitro*, surestiment toujours le rendement de dialyse puisqu'elles reproduisent uniquement les conditions de diffusion à travers la membrane semiperméable et à l'intérieur de la sonde, sans tenir compte de la tortuosité du milieu extracellulaire <sup>103</sup>. Il n'en demeure pas moins qu'elles fournissent une bonne estimation de la récupération *in vivo* lorsque les sondes sont implantées dans des systèmes fluides (sang, bile) <sup>97,157,158</sup>.

### 3.4.3. Quelques méthodes pour déterminer la récupération *in vivo*: quantification des données de microdialyse

#### 3.4.3.1. Méthode du «no-net-flux»

Cette méthode, développée par Lonnroth et ses collaborateurs, s'applique uniquement dans des conditions d'équilibre <sup>148</sup>. Elle consiste à perfuser la sonde de microdialyse avec différentes concentrations de la molécule étudiée ( $C_{in}$ ) puis à déterminer pour chacune, les différences de concentration entre la solution perfusée et le dialysat ( $C_{out}$ ) (Fig. 14). L'évolution de celles-ci en fonction de la concentration du perfusat se traduit par une droite dont la pente correspond à la récupération relative du médicament *in vivo* et l'intersection avec l'axe des abscisses à la concentration dans l'espace extracellulaire (Fig. 14).



- 4-6 concentrations
- Pente = récupération relative
- Intersection avec l'axe x = concentration du médicament dans le liquide interstitiel environnant la sonde

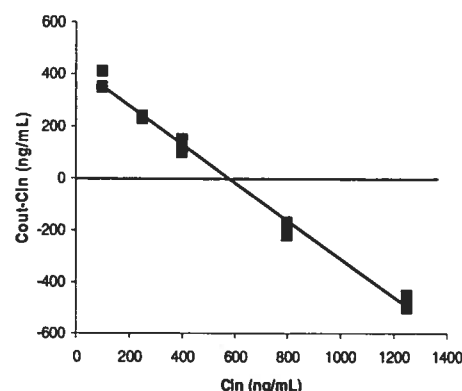


Figure 14. Méthode du «no-net-flux»

En vue d'utiliser la méthode du «no-net-flux» dans des conditions de non-équilibre pour des études cinétiques, Olson et ses collaborateurs ont proposé une version modifiée de cette approche appelée le «dynamic no-net-flux»<sup>159</sup>. Ils ont également montré que la récupération pouvait changer au cours de l'expérience indépendamment de la concentration dans le liquide extracellulaire<sup>159</sup>. Les méthodes du «no-net-flux» sont robustes, leur principal avantage consistant à utiliser le médicament lui-même pour la calibration *in vivo* des sondes. Par contre, leur mise en œuvre est longue (jusque 12 h) et parfois difficile, ce qui en diminue l'attrait<sup>92</sup>.

#### 3.4.3.2. Dialyse avec standard interne et rétrodialyse ou dialyse inverse

Une autre approche consiste à utiliser un standard interne que l'on ajoute dans le perfusat pendant toute la durée de l'expérience. Sa perte relative (PR) est alors directement liée à la récupération relative (RR) du médicament par un facteur  $k$  préalablement établi *in vitro*. De fait, les caractéristiques des deux molécules doivent être très proches, surtout en terme de coefficient de diffusion et de métabolisme<sup>149,150,160,161</sup>. Des marqueurs isotopiques ont également été utilisés pour éviter les interférences possibles

entre le médicament et le standard interne <sup>149</sup>. Cette méthode présente l'avantage de suivre les éventuels changements dans la récupération dus à une diminution de la performance de la sonde (bulles d'air, occlusion des pores de la membrane par des débris cellulaires) <sup>150,160,161</sup>. Par contre, l'estimation *in vitro* du facteur de correction  $k$  constitue sa principale faiblesse <sup>162</sup>.

En rétrodialyse ou dialyse inverse, le médicament lui-même est introduit dans le liquide de dialyse avant le début de l'expérience et sa perte relative dans le tissu est calculée (Fig. 15) <sup>163</sup>. Dans le cadre de ce projet, cette technique de mesure a légèrement été modifiée pour quantifier le RMF et son métabolite dans le liquide interstitiel du muscle chez le chien <sup>164</sup>.

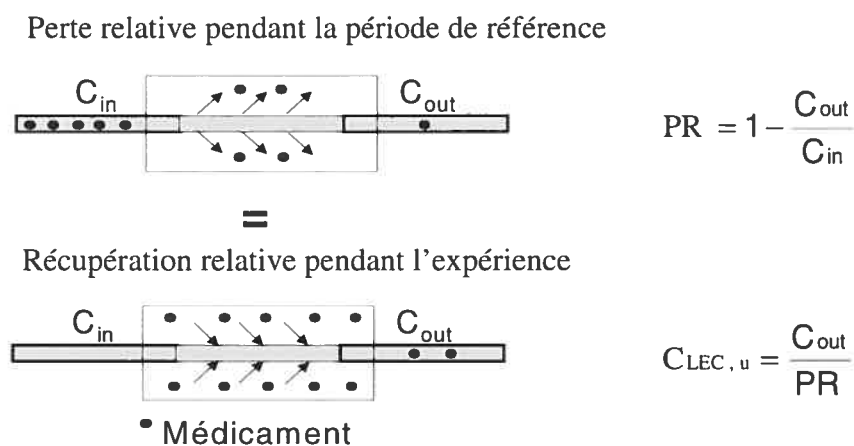


Figure 15. Méthode de la rétrodialyse avec le médicament

Cette technique, couplée à l'utilisation d'un standard interne, permet à la fois d'estimer le facteur de correction  $k$  *in vivo* et de contrôler l'évolution du rendement par la perfusion du standard interne tout au long de l'étude (Fig. 16) <sup>151</sup>. Bien que robuste, la limite de la rétrodialyse combinée réside dans le choix du standard interne. Celui-ci doit

posséder les mêmes caractéristiques physico-chimiques que la molécule étudiée et ne pas induire d'interactions pharmacologiques ou pharmacocinétiques.

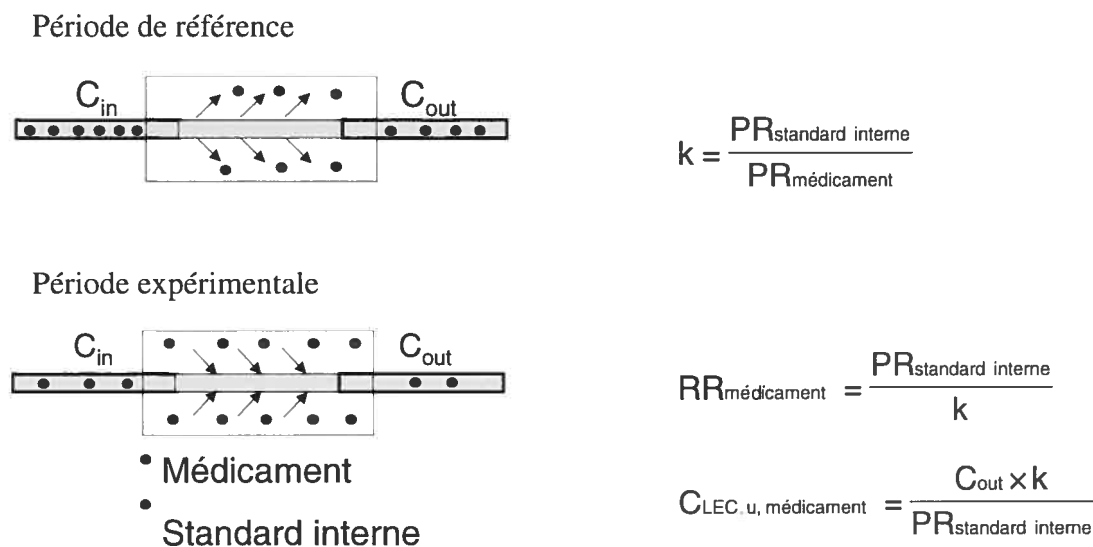


Figure 16. Méthode de la rétrodialyse combinée

### 3.5. Études pharmacocinétiques utilisant la microdialyse

En utilisant la technique de microdialyse on peut suivre continuellement les concentrations libres de médicament dans le fluide extracellulaire d'un tissu spécifique et faire plusieurs prélèvements chez le même animal. Ceci donne la possibilité de réduire le nombre d'animaux dans les protocoles de cinétique. Cette technique offre ainsi une alternative aux méthodes traditionnelles, où les concentrations tissulaires ne sont accessibles qu'une fois l'animal sacrifié. Beaucoup d'études pharmacocinétiques employant la microdialyse traitent de la distribution des médicaments dans le cerveau<sup>90</sup>. Néanmoins, l'intérêt des chercheurs pour exploiter son potentiel dans d'autres tissus périphériques tels que le sang, le foie, le cœur ou encore le tissu sous-cutané s'accroît<sup>165</sup>.

Enfin, depuis seulement 10 ans elle est utilisée dans certaines études pharmacocinétiques chez l'Homme et suscite l'intérêt de nombreuses compagnies pharmaceutiques <sup>166</sup>.

### 3.5.1. Pharmacocinétique dans le cerveau

La microdialyse dans le cerveau s'est avérée très utile pour étudier la distribution, le transport à travers la barrière hématoencéphalique et la relation concentration/effet de nombreux médicaments.

La distribution des médicaments dans le cerveau est estimée par le rapport entre les aires sous la courbe des concentrations mesurées dans le fluide extracellulaire cérébral (FECC) et dans le plasma. La morphine fut le premier alcaloïde mesuré dans le FECC chez le rat <sup>167-170</sup>. Depuis, les analgésiques <sup>110</sup> et particulièrement les opioïdes (codéine, fentanyl) <sup>171,172</sup> ont largement été étudiés, ainsi que de nombreuses autres molécules incluant les agents antibactériens <sup>173,174</sup> et antifongiques <sup>175</sup>, les nucléosides antiviraux <sup>176-178</sup>, les anticonvulsivants <sup>179,180</sup>, les méthyl xanthines <sup>181,182</sup> et le tacrine <sup>183</sup>. L'émergence de la microdialyse a également apporté une nouvelle dimension à l'étude de la distribution intratumorale des agents anticancéreux. La distribution du méthotrexate dans les tumeurs cérébrales fut ainsi estimée par de Lange et ses collaborateurs <sup>184</sup>.

Par ailleurs, la microdialyse dans le cerveau a permis de mettre en évidence certains mécanismes de transport impliqués au niveau de la barrière hématoencéphalique. En effet, en modélisant les profils de diffusion des médicaments, on a identifié un système de transport actif, sensible au probénécide. Celui-ci semble responsable des faibles concentrations de zidovudine <sup>113,177,185</sup>, de gabapentine <sup>186</sup> et de baclofène <sup>187</sup> observées dans le cerveau. De plus, cette technique a permis de démontrer que les glycoprotéines P sont impliquées au niveau de la barrière hématoencéphalique dans le transport actif des médicaments anticancéreux <sup>188-191</sup> et des opioïdes (à l'exception de la codéine) <sup>192</sup>. Ces



transporteurs jouent un rôle protecteur et assurent une fonction d'efflux cellulaire des xénobiotiques, en favorisant leur excrétion active.

Enfin, la microdialyse évaluerait l'efficacité thérapeutique ou encore la toxicité neurologique des médicaments en mesurant simultanément leur pharmacodynamie et les concentrations dans le sang et le cerveau. Ainsi, Barjavel a établi une corrélation directe entre les réponses analgésiques et les concentrations de la morphine et de ses métabolites dans le FECC <sup>193,194</sup>. De leur côté, Welty et ses collaborateurs ont identifié la cause du délai observé avant l'apparition de l'effet anticonvulsivant de la gabapentine <sup>195</sup>.

La microdialyse est sans aucun doute la méthode la plus robuste pour comparer la composition du liquide extracellulaire cérébral à celle du liquide céphalorachidien <sup>196</sup>. Le liquide extracellulaire est formé au niveau de la barrière hématoencéphalique et se dirige du cerveau vers le liquide céphalorachidien <sup>197</sup>. Ce dernier circule continuellement autour de l'encéphale et de la moelle épinière dans l'espace sous-arachnoïdien (entre l'arachnoïde et la pie-mère) ainsi que dans les ventricules. Chez l'Homme, son volume est de 140 mL et son « turnover » a lieu 4 à 5 fois par jour <sup>196</sup>. Le liquide céphalorachidien protège l'encéphale et la moelle épinière contre les traumatismes chimiques et physiques. C'est aussi un véhicule pour l'échange des nutriments et des déchets entre le sang et le tissu nerveux <sup>197</sup>, agissant comme un système de drainage équivalent au système lymphatique. Il est produit à un débit de 0.5 mL/min par les épendymocytes dans les plexus choroïdes, selon un processus de filtration à partir du plasma <sup>196</sup>. Tandis que les capillaires choroïdes de type fenestrés sont perméables à toutes les petites molécules, les cellules épithéliales du plexus choroïde sont réunies par des jonctions serrées formant la barrière sang-liquide céphalorachidien <sup>197</sup>. Dans les plexus choroïdes latéraux le liquide céphalorachidien, auquel s'ajoute une faible quantité provenant du liquide extracellulaire cérébral, s'écoule dans le troisième ventricule, puis traverse l'aqueduc du mésencéphale avant de rejoindre le quatrième ventricule. Il entre ensuite par trois ouvertures dans le canal central de la moelle épinière et dans l'espace sous-arachnoïdien où il est graduellement réabsorbé dans la circulation sanguine par les

villosités arachnoïdiennes <sup>197</sup>. Bien que le liquide interstitiel cérébral et le liquide céphalorachidien soient formés indépendamment l'un de l'autre (endothélium cérébral et plexus choroïde), il existe un échange étroit entre les deux compositions <sup>198</sup>. Ainsi, lorsqu'on administre un médicament par voie *iv*, la concentration dans le liquide céphalorachidien est un indice indirect de celle dans le liquide extracellulaire cérébral. Une divergence entre les deux est parfois observée selon le degré de lypophilie du médicament estimé par son coefficient de partage octanol-eau, ainsi que sa capacité à interagir avec les protéines de la résistance multi-drogue (Pgp, MRP) exprimées à la surface des cellules endothéliales <sup>199</sup>. L'activité biologique est une mesure générale du passage à travers le cerveau <sup>199</sup>. On a observé que l'action hypnotique de certains dépresseurs du système nerveux central était maximale lorsque le coefficient de partage octanol-eau avoisinait la valeur de deux. Cette règle, confirmée par plusieurs chercheurs, est aujourd'hui généralement acceptée <sup>199</sup>.

### 3.5.2. Pharmacocinétique dans les tissus périphériques

Avec l'insertion des sondes de microdialyse dans les tissus périphériques, on peut effectuer des prélèvements directement au niveau de sites, considérés jusqu'alors inaccessibles. Les applications pharmacocinétiques dans ce cas concernent essentiellement l'étude de la distribution et du métabolisme des médicaments.

La microdialyse a notamment permis de mesurer les concentrations interstitielles d'antibiotiques dans le muscle <sup>200-202</sup> et le poumon chez le rat <sup>201,203</sup>. De plus, les concentrations de la gallamine dans le muscle <sup>204</sup>, du propranolol <sup>205</sup> et de l'allopurinol <sup>206</sup> dans le tissu cardiaque ont aussi été mesurées afin d'estimer leur distribution tissulaire. D'autre part, en facilitant l'échantillonnage simultané dans différents tissus, la microdialyse a contribué à mieux caractériser la distribution et le métabolisme de certains principes actifs tels que l'acétaminophène <sup>114,207</sup>, l'acide acétylsalicylique <sup>207</sup>, la morphine <sup>168</sup>, la pipéracilline <sup>200</sup>, la gentamycine <sup>155</sup>, le fluconazole <sup>175</sup>, carbamazépine <sup>208</sup> et la zidovudine



<sup>113,209</sup>. Par ailleurs, des modèles tumoraux ont été utilisés pour analyser la distribution d'agents anticancéreux tels que le méthotrexate <sup>184,210-212</sup>. Enfin, en appliquant la microdialyse directement dans le courant sanguin <sup>102,213</sup> on a déterminé *in vivo* le profil pharmacocinétique et la liaison aux protéines plasmatiques <sup>163,214</sup> de plusieurs molécules comme le valproate <sup>215</sup>, le glucose et le lactate <sup>216</sup>.

### 3.5.3. Études chez l'Homme

Chez les volontaires sains et les patients, la microdialyse est avant tout employée pour évaluer la distribution de médicaments dans différents tissus <sup>166</sup>. Ainsi, celle de nombreux agents antiinfectieux et antiviraux (peciclovir), a été étudiée au niveau du muscle <sup>217-220</sup>, du cerveau <sup>221</sup> et du poumon <sup>217</sup>. Pour ces classes de médicaments, la microdialyse offre une alternative aux biopsies et aux alvéoles cutanées souvent associés à des réactions inflammatoires <sup>222</sup>. Les biopsies présentent l'inconvénient de mélanger les compartiments intracellulaires, interstitiels et vasculaires, ce qui complique l'interprétation de la concentration totale mesurée <sup>166</sup>. De plus, elles ne permettent pas de suivre la diffusion du médicament à travers la peau après une administration topique. En microdialyse, les sondes peuvent être implantées dans les différentes couches de l'épiderme, pour mesurer le gradient de concentration du médicament à travers la peau. C'est ainsi que la diffusion des médicaments antiinflammatoires <sup>223</sup>, de l'éthanol, de la nicotine, de l'estradiol, de l'acide salicylique, des anesthésiques locaux et des solvants organiques a été mesurée <sup>224</sup>. La microdialyse représente un outil intéressant dans les études de bioéquivalence des produits topiques, ainsi qu'en toxicologie <sup>225</sup>. Par ailleurs, elle a été utilisée pour étudier la distribution d'un bon nombre d'agents antinéoplasiques au sein du tissu tumoral. Des études effectuées sur des mélanomes malins et des cancers du sein ont montré qu'il n'y a pas de corrélation entre les concentrations de médicaments dans le sang et dans les tumeurs <sup>224,226-228</sup>. Aussi, la microdialyse représenterait un outil intéressant pour sélectionner les molécules antinéoplasiques qui diffusent le mieux à l'intérieur des tumeurs

solides<sup>165,224</sup>. Enfin, dans le cerveau, cette technique permet de suivre la diffusion des médicaments antiépileptiques et antibiotiques à travers la barrière hématoencéphalique<sup>221,224,229-232</sup>.

Les données sur la distribution périphérique des médicaments obtenues au moyen de la microdialyse sont également utiles en modélisation PK-PD. On peut alors évaluer *in vivo* la relation dose/réponse de médicaments n'agissant pas au niveau central. Pour ces derniers, les concentrations mesurées directement dans la biophase, procurent une meilleure prédiction de l'effet observé et mènent à des régimes posologiques plus adaptés. Ainsi, cette approche contribue à optimiser la posologie des antibiotiques et à établir des directives de traitement pour certaines infections<sup>217,219,220,224,233</sup>. De plus, des études préliminaires ont montré une excellente corrélation entre les concentrations d'agents cytotoxiques retrouvés dans les tumeurs solides et la réponse aux traitements de chimiothérapie<sup>234</sup>. Ainsi, la microdialyse expliquerait les cas de résistance médicamenteuse observés chez certains patients et par conséquent, prédirait le succès ou l'échec d'une chimiothérapie. Enfin, des médicaments ajoutés dans le perfusat peuvent également être administrés localement pour pouvoir mesurer leurs effets<sup>235</sup>.

Les organismes réglementaires (Food and Drug Administration) accordent de plus en plus d'intérêt aux concentrations de médicaments dans les tissus. Les directives des études précliniques recommandent fréquemment l'emploi de la microdialyse et elle est également mentionnée pour les agents anti-infectieux et les médicaments topiques dans les directives des études cliniques.

#### 4. Électroencéphalographie

L'activité électrique cérébrale a été mise en évidence en 1875 par Caton <sup>236</sup>. Elle fut enregistrée pour la première fois chez le chien par Prawdicz-Neminsky en 1913 et chez l'Homme en 1924 par Hans Berger <sup>237</sup>. Celui-ci publia sa découverte en 1929 et donna à ses enregistrements le nom d'électroencéphalogramme (EEG) <sup>237</sup>.

Depuis, grâce au perfectionnement des méthodes d'amplification et d'enregistrement, l'électroencéphalographie occupe une place considérable en neurophysiologie clinique <sup>238-240</sup>. Récemment, l'avènement des méthodes d'analyse quantitative a ouvert de nouvelles applications dans l'étude pharmacodynamique des médicaments psychotropes et le suivi clinique du niveau d'anesthésie <sup>241</sup>. Ce chapitre traite, dans un premier temps, des fondements physiologiques sous-jacents au signal EEG et de la technique proprement dite, pratiquée chez le chien (équipement, méthode analytique). Dans un deuxième temps, nous comparerons les EEG enregistrés chez des chiens ayant reçu ou non des opioïdes. Enfin, nous discuterons de l'application de l'électroencéphalographie dans l'étude pharmacodynamique des opioïdes.

##### 4.1. Bases physiologiques de l'électroencéphalographie

L'EEG est un enregistrement de l'activité électrique spontanée des couches superficielles du cortex cérébral. Les autres parties du cerveau peuvent influencer le signal mais ne contribuent pas directement aux voltages mesurés. Les potentiels de surface ont une polarité qui fluctue à l'intérieur d'une bande de fréquence relativement étroite (0,5-50 Hz) dont une grande partie est inférieure à 30 Hz. L'amplitude des ondes individuelles enregistrées par des électrodes de surface atteint plusieurs centaines de microvolts <sup>242</sup>. Comprendre l'électroencéphalographie revient à élucider les origines de l'oscillation constante et rythmique qui caractérise l'activité électrique corticale.

#### 4.1.1. Origines de l'activité cérébrale<sup>197</sup>

Le système nerveux est constitué par les cellules nerveuses, ou neurones et par des cellules satellites, les cellules gliales. Les neurones représentent les unités fonctionnelles élémentaires du tissu nerveux. Leur particularité tient au fait que leur membrane soit excitable, c'est-à-dire qu'elle puisse engendrer un message électrochimique ou potentiel d'action, créé par des déplacements ioniques. En effet, les neurones maintiennent grâce à des mécanismes actifs, une différence de concentration ionique entre le milieu intra et extra-cellulaire qui se traduit par une différence de potentiel de l'ordre de 50 à 80 mV. Lorsque cet équilibre est rompu, un influx nerveux composé d'une dépolarisation se propage en quelques millisecondes d'un bout à l'autre de la cellule nerveuse, puis un retour à l'état d'équilibre initial est observé. Les potentiels d'action véhiculent l'information à l'intérieur du cerveau ainsi que vers les organes effecteurs. Les neurones possèdent deux types d'extensions cytoplasmiques nécessaires à leur réception et à leur transmission. D'une part, les axones sont des extensions efférentes conduisant les potentiels d'action générés vers d'autres cellules (Fig. 17 a). D'autre part, les dendrites sont des extensions afférentes où sont collectées les informations arrivant au neurone (Fig. 17 a). Les échanges d'information entre les cellules sont réalisés au niveau des synapses (Fig. 17 b). Ce sont des régions d'intime contiguïté entre deux structures excitables, où la communication s'établit par un simple couplage électrique des deux membranes ou par la libération d'un neuromédiateur présynaptique. Celui-ci se fixe sur l'élément postsynaptique grâce à un récepteur adéquat, pour assurer la propagation du potentiel d'action<sup>243</sup>.

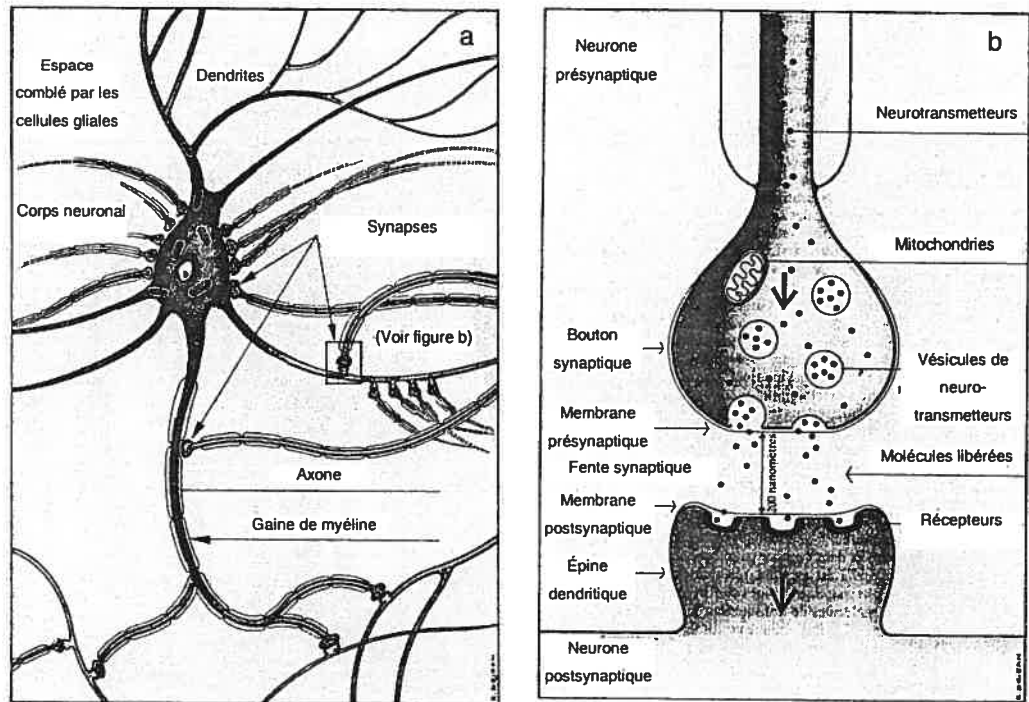


Figure 17. a) Représentation d'un neurone et de ses connexions. b) Synapse<sup>244</sup>

#### 4.1.2. Sources du signal EEG

Le signal EEG provient essentiellement de deux sources : l'activité synaptique des neurones corticaux et le changement du potentiel membranaire des cellules gliales<sup>245</sup>. L'excitation d'un neurone favorise le mouvement d'ions  $\text{Na}^+$  à travers la membrane postsynaptique ce qui induit un courant intracellulaire qui tend à rééquilibrer les charges. La redistribution des charges crée, dans le même temps, un courant extracellulaire (Fig. 18). Ces courants transmembranaires « primaires » donnent lieu à des courants secondaires dits volumiques. Les différences de potentiel mesurées entre deux électrodes en électroencéphalographie sont essentiellement dues aux courants extracellulaires et volumiques<sup>245,246</sup>.

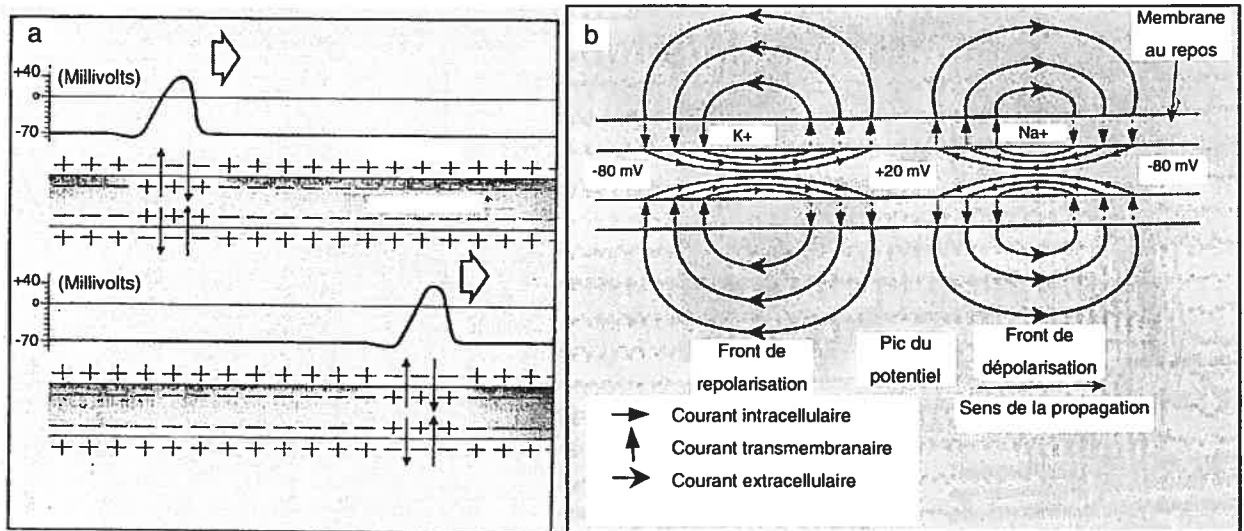


Figure 18. a) Propagation d'un influx nerveux. b) Courants transmembranaires générés par un potentiel d'action <sup>244</sup>

La contribution des cellules gliales au signal EEG provient de la dépolarisation des neurones. En effet, les variations passagères de la concentration du K<sup>+</sup> extracellulaire qui en résulte induisent des dépolarisations passives des cellules gliales. Leur couplage électrique étroit permet alors de propager les courants et d'amplifier ainsi le signal initial <sup>247-249</sup>

On distingue deux formes principales de cellules nerveuses (Fig. 19). Les cellules pyramidales du cortex cérébral (à champ ouvert) sont probablement la source neuronale majeure de l'EEG (Fig. 19 a). Leurs dendrites sont longs et arrangés parallèlement les uns aux autres. Par conséquent, des potentiels postsynaptiques peuvent avoir lieu dans une partie de la cellule alors que l'autre est au repos. Les

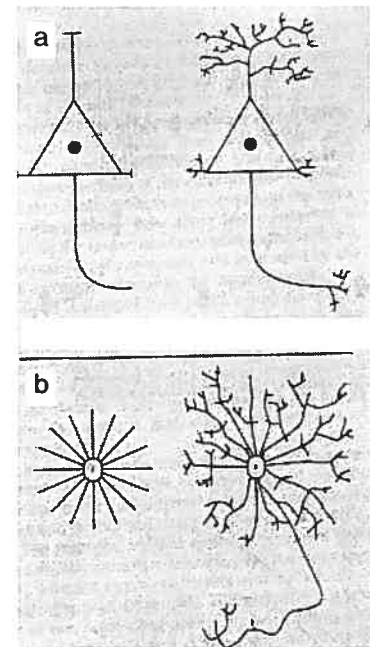


Figure 19. a) Cellule pyramidale b) Cellule étoilée <sup>244</sup>

dipôles ainsi formés provoquent une dispersion et une propagation des courants ioniques intra- et extracellulaires entraînant un effet de surface important <sup>245</sup>. En revanche, les cellules des structures internes plus profondes (cellules granulaires des noyaux gris centraux) possèdent des dendrites ramifiés plus courts, arrangés de façon radiale autour du corps cellulaire (à champ fermé) (Fig. 19 b). Elles produisent des petits dipôles ayant peu d'influence sur l'EEG car les courants induits sont atténués avant d'atteindre la surface du crâne <sup>245,250</sup>.

Par ailleurs, les potentiels d'action furtifs génèrent le long des axones deux courants de sens opposés et un champ magnétique quadripolaire qui s'atténue très vite, sans rejoindre la surface (Fig. 20) <sup>246</sup>. Les potentiels d'action «tout ou rien» issus d'une décharge épileptique ou de potentiels évoqués peuvent néanmoins contribuer au signal enregistré car le stimulus induit une activité synchronisée dans un grand nombre d'axones voisins <sup>245,251</sup>.

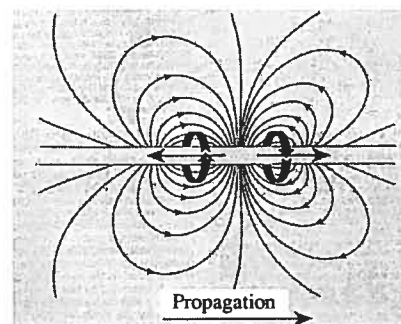


Figure 20. Configuration quadripolaire associée au courant propagé par un potentiel d'action <sup>244</sup>

#### 4.1.3. Polarité et amplitude des ondes EEG

Lorsqu'un neuromédiateur se fixe sur l'élément post-synaptique grâce à un récepteur adéquat, il produit un potentiel exciteur (ouverture de canaux  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou inhibiteur (ouverture de canaux  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{K}^+$ ). Aussi, le rôle du neurone est d'intégrer les messages post-synaptiques pour moduler sa propre production de potentiels d'action. La polarité apparente des potentiels enregistrés à la surface des électrodes dépend alors de la nature excitatrice ou inhibitrice du signal généré.

Le soma d'un neurone est ainsi le lieu d'une addition d'effets excitateurs et inhibiteurs. Toutefois, il est généralement admis que les courants générés par une seule

cellule seraient trop faibles pour pouvoir être détectés<sup>252,253</sup>. En effet, seuls les courants générés par l'activité synaptique synchrone d'une population de neurones de même orientation (entre  $10^7$  et  $10^9$ ), engendrent un potentiel électrique suffisant, perceptible à la surface du crâne<sup>252,253</sup>. La présence d'une activité rythmique et superficielle indique clairement qu'il existe une synchronisation entre les synapses. Celle-ci provient d'une superposition des dipôles dans l'espace et dans le temps entraînant l'addition de plusieurs potentiels individuels à des niveaux décelables<sup>245</sup>.

Par conséquent, deux facteurs jouent un rôle dans le signal EEG : l'alignement des cellules et le synchronisme des décharges électriques cellulaires (Fig. 21). L'effet net sur le potentiel de surface serait nul si les cellules étaient organisées de manière aléatoire ou si les potentiels postsynaptiques étaient asynchrones<sup>245</sup>. Les courants résultant de l'activité d'une macrocolonne de neurones sont modélisés par un dipôle de courant, dont la direction est donnée par l'orientation principale des dendrites (i.e. perpendiculairement à la surface corticale) et dont l'amplitude représente l'intégrale des densités de courant dans la colonne considérée<sup>245</sup>.

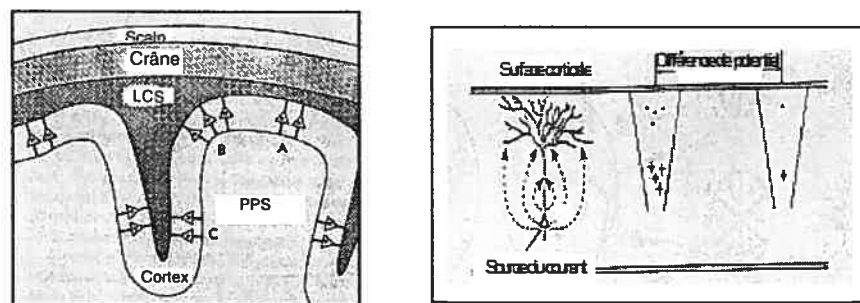


Figure 21. Alignement des cellules pyramidales et potentiel de surface induit par l'activité neuronale<sup>244</sup>



## 4.2. Appareillage

Les différences de potentiels créées par les neurones sont captées à la surface du crâne puis amplifiées et inscrites. En électroencéphalographie de routine, ces trois étapes sont réalisées respectivement par les électrodes, les amplificateurs et les enregistreurs.

### 4.2.1. Électrodes

Elles assurent la captation et la transmission de l'activité électrique cérébrale vers les amplificateurs. Deux types d'électrodes dites « non polarisables » sont utilisés pour les mesures chez l'animal. Les électrodes en aiguille sont directement insérées dans le tissu sous-cutané du crâne. Les électrodes circulaires, en argent recouvert de chlorure d'argent, sont enduites d'une pâte conductrice destinée à diminuer l'impédance de contact avec le scalp (1 à 5 K $\Omega$ ) et sont maintenues en place par collage<sup>242</sup>.

Les électrodes sont disposées en plusieurs points du crâne, correspondant à une localisation anatomique du cerveau (frontale, centrale, pariétale, temporale, occipitale), symétriquement par rapport à une ligne médiane. Les dérivations sont constituées par des couples d'électrodes entre lesquelles on enregistre une différence de potentiel. Les montages doivent permettre d'identifier de manière exacte et simple les événements EEG locaux et diffus. Les plus couramment utilisés sont dits bipolaires, transversaux ou longitudinaux car ils permettent d'explorer la surface du scalp dans les deux directions<sup>242,254</sup>. Ils consistent à relier les électrodes par paires à un amplificateur, avec généralement trois électrodes en ligne, dont l'une est commune (Fig. 22 a). Les événements enregistrés ainsi dans les deux canaux apparaissent de manière réciproque<sup>242,254</sup>. Par ailleurs, les montages référentiels enregistrent le potentiel de chaque électrode par rapport au potentiel d'une électrode de référence, indifférente à l'activité cérébrale (Fig. 22 b)<sup>242,254</sup>. En fonction de celle-ci, chaque électrode active peut donner une information topographique. De cette manière, les événements ne sont pas réciproques mais leur amplitude varie plutôt

en fonction de la distance entre les électrodes actives et la référence <sup>242,255</sup>. Cependant, qu'elle soit céphalique ou extra-céphalique, l'électrode de référence est rarement indifférente. Souvent, elle enregistre des tensions cérébrales par simple contiguïté, ou encore, des artefacts provenant de l'électrocardiogramme dont la tension est mille fois plus élevée <sup>256</sup>. Par conséquent, ces inconvénients ont beaucoup réduit l'utilisation des montages référentiels au profit des montages bipolaires.

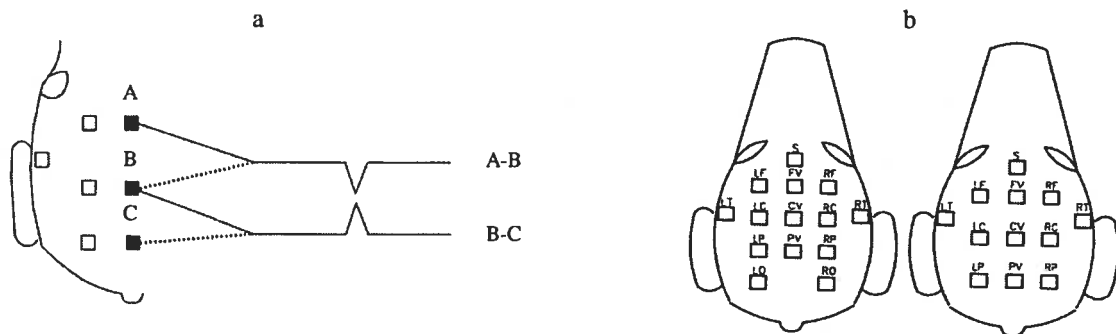


Figure 22. a) Montage bipolaire. b) Montages combinés : bipolaire et référentiel <sup>242</sup>

#### 4.2.2. Amplificateurs

Les appareils enregistreurs utilisés en électroencéphalographie doivent mettre en évidence, après les avoir amplifiées, des tensions de l'ordre de 5 (tension normale) à 200  $\mu\text{V}$  (paroxysme) et dont les fréquences oscillent entre 0,2 et 80 <sup>242,254,257</sup>. Pour cela, ils comportent un certain nombre d'étages (amplificateurs différentiels), de sorte qu'à la sortie, un signal de 50  $\mu\text{V}$  représente une déflexion de 5 ou 10 mm. Ainsi, leur précision est généralement de l'ordre de 90% pour une bande passante de 0,1 à 100 Hz <sup>242,254,257</sup>. De plus, ils permettent de discriminer les signaux bioélectriques locaux des signaux diffus provenant de l'électrogenèse cardiaque ou musculaire. Par ailleurs, les

amplificateurs différentiels possèdent des filtres capables de supprimer l'amplification des basses fréquences en vue d'éliminer des oscillations lentes provenant de signaux non bioélectriques (« constante de temps ») <sup>242,254,257</sup>. Des filtres passe-bas sont également disponibles pour supprimer les fréquences rapides qui ne sont pas d'origine cérébrale et dont l'inscription gêne la lecture du tracé <sup>242,254,257</sup>. Enfin, ces appareils disposent d'un filtre spécial à 60 Hz qui permet d'éliminer la fréquence du réseau de distribution alternatif responsable d'importantes perturbations <sup>242,254,257</sup>. À partir du dispositif d'amplification, le signal est ensuite transmis à un enregistreur à plume ou stocké sous forme de données numériques dans un ordinateur pour une analyse automatique.

### 4.3. Interprétation du signal EEG

Il existe deux méthodes d'interprétation du signal EEG, l'inspection visuelle et l'analyse automatique par ordinateur. Bien que l'analyse visuelle puisse paraître empirique, elle fournit des informations utiles lorsqu'elle est pratiquée par des personnes expérimentées.

#### 4.3.1. Analyse visuelle

Le signal est constitué d'une activité de fond et d'événements passagers, focaux, multifocaux ou généralisés. Les activités de fond sont caractérisées par leur fréquence et leur amplitude. La fréquence est définie comme le nombre de fois que l'onde change de polarité par seconde et son unité est en Hz. L'amplitude réfère à la valeur de ces changements en terme de voltage. Mesurée depuis le pic négatif jusqu'au pic positif ou vice versa, sa valeur est généralement comprise entre 20 et 100.µV. Chez le chien, ce rythme est compris entre 0,5 et 30 <sup>242</sup>. Quatre bandes de fréquence ont été définies : 0,5-3,5 Hz (delta), 3,5-7,5 Hz (thêta), 7,5-13,5 Hz (alpha), 13,5-25 Hz (bêta).



Les événements passagers sont furtifs et durent moins de quelques secondes. Leur forme est distincte de celle de l'activité de fond qu'ils superposent ou remplacent. Ils peuvent être normaux ou pathologiques. Ainsi, les décharges paroxysmales sont des événements passagers anormaux associés à des crises. Bien que furtifs, les artefacts ne sont pas considérés comme des événements passagers <sup>242</sup>.

Avec l'expérience, beaucoup d'artefacts peuvent être identifiés au moment de l'interprétation. Il est néanmoins recommandé de noter tous les événements susceptibles d'en provoquer pendant l'enregistrement. Les plus courants sont ceux reliés aux mouvements, à l'électrocardiogramme, la respiration et moins souvent à la déglutition et aux mouvements des mandibules <sup>242</sup>. Les artefacts musculaires proviennent essentiellement des muscles faciaux et de la mastication. Ils causent des fréquences élevées, intermittentes ou continues, pouvant obscurcir complètement l'activité de fond. Cependant, ils disparaissent rapidement lorsque l'animal est anesthésié ou après une injection de lidocaïne <sup>242</sup>. Les artefacts liés à la respiration sont des ondes lentes, synchronisées avec les mouvements de la tête et du corps et associées à l'inspiration ou l'expiration du chien haletant. Difficilement identifiables lors de l'interprétation, des tests sont nécessaires au cours de l'enregistrement pour s'assurer que l'activité lente mesurée provient bien du cerveau <sup>242</sup>. Les mouvements des yeux provoquent également des ondes lentes qui interfèrent avec le signal, mais l'enregistrement parallèle de l'électrooculogramme aide à identifier cet artefact. Celui-ci est souvent associé aux mouvements des paupières, de la tête et par le fait même aux potentiels musculaires <sup>242</sup>. Enfin, l'enregistrement de l'électrocardiogramme est utile pour identifier le complexe QRS pouvant facilement être confondu avec une pointe sur le tracé EEG <sup>242</sup>.

#### 4.3.2. Analyse automatique

L'analyse automatique permet de quantifier le signal EEG <sup>258</sup>. Le signal électrique analogique produit par le cerveau est un signal continu, variant en fonction du temps,



caractérisé par sa fréquence et son intensité. Comme toute information, il doit être transformé sous forme binaire pour être manipulable par un ordinateur; c'est l'opération de conversion analogique-digitale (ou numérisation) qui a lieu en trois étapes: le signal est d'abord découpé en segments de durées égales puis échantillonné à fréquence fixe pour en donner une valeur comprise entre un minimum et un maximum. La fréquence d'échantillonnage doit être au moins le double de la fréquence maximale du signal (théorème de Shannon) pour éviter toute perte d'information. En effet, des interférences proches de la fréquence d'échantillonnage peuvent générer un signal « fantôme » de basse fréquence (phénomène d'« aliasing »). En général, pour le traitement de l'EEG, on échantillonne à une fréquence de 100 Hz <sup>257</sup>. La hauteur de chaque segment est alors quantifiée (en prenant une valeur moyenne) puis codée sous forme numérique. Plus la longueur du mot binaire utilisé pour représenter la hauteur est grande, plus on peut définir de niveaux différents d'intensité et plus la précision sera importante.

La séquence de traitement comporte une première phase simple visant à améliorer la qualité du signal (extraction du bruit de fond, amplification, filtration) puis une étape de traitement analytique permettant l'extraction de paramètres divers par des méthodes mathématiques.

Pour quantifier le signal numérique provenant du EEG <sup>259</sup>, l'analyse de Fourier est la plus courante (Fig. 23). Elle permet de calculer le spectre de puissance du signal dans les quatre bandes de fréquences : delta (0-3,5 Hz), thêta (3,5-7,5 Hz), alpha (7,5-13,5 Hz) et bêta (13,5-25 Hz) <sup>241</sup>. Elle décompose chaque tronçon du signal EEG en une somme de sinusoïdes de fréquences et de voltage différents, de manière à ce que leur superposition redonne le signal EEG initial. Selon la fréquence d'échantillonnage, certaines approximations sont acceptées pour accélérer le calcul : c'est la transformée de Fourier rapide ou FFT qui transforme un tronçon de EEG (c'est-à-dire un voltage variant au cours du temps) en son spectre de fréquences. Ce dernier représente en abscisse les différentes fréquences des sinusoïdes qui composent le signal et en ordonnée leur voltage ou leur puissance. Les résultats bruts sont alors représentés sous forme de puissance absolue ou

relative dans les différentes bandes de fréquence. Cette méthode d'analyse a été utilisée pour traiter les données brutes de EEG après l'administration de RMF chez le chien anesthésié, dans le cadre de ce projet de recherche <sup>260</sup>. Il faut noter que la FFT assume un signal périodique en tout temps; mais en réalité, il est rare que le tronçon du EEG sélectionné pour l'analyse soit le multiple d'un cycle périodique. Ces irrégularités contribuent à la défaillance du spectre de puissance appelé « spectral leakage ». Pour prévenir ce phénomène, on applique une fenêtre correspondant à un filtre dans le temps qui impose une régularité au signal EEG.

D'autres paramètres tels que le rebord spectral 95%, représentant la fréquence en dessous de laquelle se trouve 95% de la puissance totale ou le rebord spectral 50% (fréquence médiane) peuvent être employés. Ces derniers ont le désavantage de dépendre des changements survenant dans l'ensemble des bandes <sup>241</sup>. Tous ces paramètres sont utilisés pour mesurer l'effet d'un médicament agissant sur l'activité électrique des neurones, mais il s'agit de choisir le plus pertinent d'entre eux. Bien que d'un point de vue physiologique les bandes de fréquence soient indépendantes les unes des autres, leurs limites ne sont pas strictes et peuvent varier selon les espèces, les populations ou encore les conditions expérimentales <sup>241</sup>

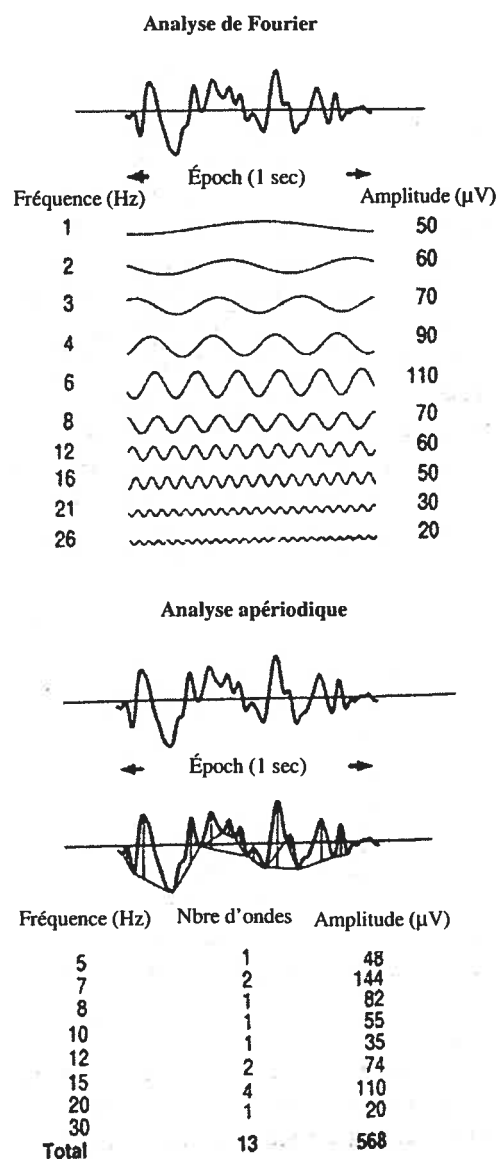


Figure 23. Comparaison schématique de l'analyse de fourier et de l'analyse apériodique <sup>241</sup>.

Par ailleurs, l'analyse aperiodique constitue une méthode alternative pour quantifier le signal EEG (Fig. 23)<sup>241</sup>. Elle se base sur une analyse par onde et compte le nombre de fois que le tracé EEG croise la ligne isoélectrique par unité de temps (fréquence moyenne) et la puissance totale du signal EEG. Les paramètres de base qui en découlent sont le nombre d'ondes et les amplitudes totales, dans les bandes de fréquences sélectionnées. Ils définissent la puissance des signaux mais peuvent changer de façon indépendante sous l'effet d'une drogue. Les deux méthodes analytiques ont conduit aux mêmes relations temps / effet lors de l'analyse pharmacodynamique de l'heptabarbital et semblent, par le fait même, équivalentes<sup>241</sup>.

Enfin, l'indexe bispectral (BIS) est une nouvelle technique d'analyse spectrale proposée comme une mesure pharmacodynamique de l'effet anesthésique sur le système nerveux central<sup>261</sup>. Les différentes sinusoïdes du spectre de fréquence peuvent être synchronisées entre elles, c'est-à-dire atteindre leur valeur maximale en même temps ou, à l'inverse, de façon aléatoire. Entre ces extrêmes, tous les intermédiaires existent. Le degré de synchronisation des différentes sinusoïdes entre elles est à la base de l'analyse bispectrale (BIS) de l'EEG. Celle-ci examine deux à deux les sinusoïdes qui composent le spectre et recherche celles qui sont corrélées, à la fois par l'amplitude et par la phase (déflexion du signal par rapport à la ligne de base). Puis, elle fait le rapport de leur puissance sur la puissance totale pour bâtir un indexe bispectral variant de 0 à 100. Une valeur de BIS proche de 100 correspond à l'absence de corrélation de phase et se rencontre chez le sujet éveillé. Lorsque cette valeur est basse, elle témoigne de la présence dans le spectre de nombreuses sinusoïdes liées par leur phase et indique une anesthésie profonde<sup>261</sup>. Le mouvement à l'incision de la peau est souvent utilisé comme le premier signe d'un niveau d'anesthésie inapproprié, du fait que c'est un paramètre bien défini, et cliniquement probant. L'étude de Sebel démontre que le BIS est un bon indicateur du niveau de conscience puisqu'il prédit de manière significative les réponses à l'incision avec des agents tels que le propofol ou l'isoflurane<sup>262</sup>. Il existe également une bonne corrélation

entre les changements du BIS et le degré de conscience apprécié selon une échelle d'observation chez des patients sous propofol <sup>263</sup>.

#### 4.4. Caractéristiques des tracés EEG chez le chien

Des tracés EEG chez le chien ont été enregistrés cliniquement sans prémédication <sup>264</sup>, sous sédation <sup>238,265</sup> et même sous anesthésie générale <sup>266,267</sup>.

##### 4.4.1. États normaux de conscience

Les activités de fond chez les animaux normaux varient en fonction de l'état d'éveil ou de sommeil dans lequel ils se trouvent <sup>268</sup>. Pour effectuer des interprétations exactes des tracés EEG, les différents états de vigilance doivent être bien connus. Ils comprennent : l'éveil, le rythme alpha, la sédation, le sommeil lent, et le sommeil paradoxal <sup>268</sup>.

L'état d'éveil est caractérisé par un comportement alerte ; l'animal répond aux perturbations environnementales, avec des mouvements inquisiteurs de la tête, des yeux et des oreilles. Les activités de fond de cet état sont de faible amplitude (< 20 mV), et les fréquences élevées (15-25 Hz) prédominent. Les artefacts musculaires sont nombreux <sup>242</sup>.

Le rythme alpha stable est rapporté chez le chien lorsque l'animal, maintenu dans une ambiance calme, ferme les yeux. Ces périodes sont courtes (8-15 s) et sont généralement suivies, soit d'une période de haute fréquence correspondant à l'éveil de l'animal ou d'une période de basse fréquence si celui-ci s'endort <sup>269,270</sup>. Pour identifier les rythmes alpha, une stimulation de la réactivité de l'EEG est nécessaire.

Pendant la sédation, les chiens sont couchés avec les yeux partiellement ou complètement fermés mais peuvent s'éveiller à la moindre stimulation extérieure. Les



fréquences prédominantes sont les ondes de fréquences 6-8 Hz et 10-20 Hz d'une amplitude de 10-20  $\mu\text{V}$  <sup>242</sup>. S'ils ne sont pas dérangés les chiens entrent dans une phase de sommeil profond.

Pendant le sommeil lent, les chiens sont couchés et apparemment insensibles aux perturbations environnementales, seuls des stimuli forts peuvent les réveiller. Les rythmes prédominants sont de basse fréquence 2-4 Hz, superposés par des amplitudes plus faibles dans des fréquences entre 6-10 Hz. Les amplitudes dans cette phase atteignent parfois 100  $\mu\text{V}$  <sup>242</sup>.

Pendant la phase de sommeil paradoxal, les fréquences des ondes prédominantes augmentent et les amplitudes diminuent. Les activités de fond ressemblent à celles de l'éveil. Cette phase s'accompagne de mouvements oculaires, des pattes et de la gueule ainsi que de sons <sup>242</sup>.

Certains évènements passagers normaux peuvent apparaître pendant le sommeil lent (complexes K) <sup>254,271</sup>, le sommeil paradoxal (pointes), lors de stimuli auditifs pendant la sédation (pointes vertex) <sup>267</sup> ou lors des mouvements oculaires (rafales 4 à 6 Hz) <sup>271</sup>.

#### 4.4.2. Effets des opioïdes sur le tracé EEG

Les effets d'une dose de narcotique injectée par voie *iv* ont été étudiés chez le chien par des méthodes visuelles et automatisées (Fig. 24). Une analyse quantitative a été effectuée sur une période de 60 min suivant l'injection de morphine, de fentanyl, de sufentanil et d'alfentanil <sup>272</sup>. Elle comprenait l'analyse de la puissance spectrale de trois dérivations à l'aide d'un programme de transformé de Fourier sur des intervalles ou époques successifs (5,12 s). La puissance a été calculée dans 7 bandes de fréquences prédéfinies : 0,5-3,5 Hz (delta), 3,5-7,5 Hz (thêta), 7,5-9,5 Hz (alpha 1), 9,5-13,5 Hz (alpha 2), 13,5-17,5 Hz (bêta 1), 17,5-25 Hz (bêta 2), >25 Hz <sup>272</sup>.



La morphine, le fentanyl, le sufentanil et l'alfentanil augmentent l'amplitude et diminuent la fréquence de l'EEG chez le chien dans les structures étudiées. L'activité prédomine dans les bandes de fréquence thêta et delta <sup>272</sup>. De plus, ces molécules provoquent des rafales en pointes dans les dérivations corticales. Celles-ci apparaissent sous forme d'ondes effilées biphasiques dont la fréquence est plus faible que les rafales apparaissant pendant le sommeil naturel. Ces événements sont plus prononcés avec l'alfentanil, qu'avec les opioïdes de plus longue durée d'action comme la morphine. Enfin, des complexes de pointe ou poly-pointe sont observés dans les dérivations corticales et sous-corticales. Ces événements passagers demeurent isolés, peu fréquents et ne sont pas associés à des signes cliniques de crises liés aux doses administrées <sup>272</sup>. Toutefois, certaines différences existent entre les molécules. Ainsi, l'augmentation de la puissance dans la bande delta est de courte durée pour le fentanyl. Le sufentanil augmente la puissance dans la bande alpha 2 (9,5–13,5 Hz), et l'alfentanil augmente la puissance dans la bande thêta plus longtemps que dans la bande delta <sup>272</sup>.

La contribution de la bande de fréquence delta à la puissance totale du signal augmente et celle de la bande bêta diminue avec tous les narcotiques. Ceci confirme qu'ils augmentent l'activité lente et diminuent l'activité rapide. Contrairement à ses analogues, l'alfentanil diminue la contribution relative de la bande thêta. Ceci signifie que l'augmentation en delta est nettement plus importante qu'en thêta, malgré une augmentation de la puissance dans l'ensemble des bandes <sup>272</sup>.

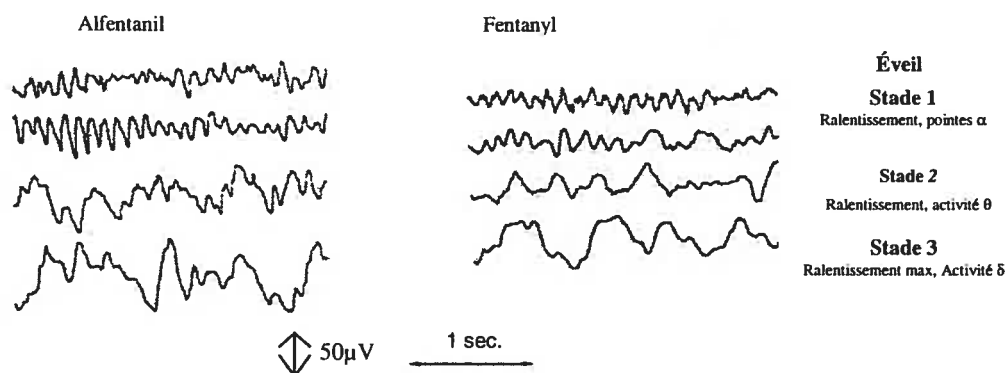


Figure 24. États des EEG induits par l'alfentanil et le fentanyl <sup>45</sup>

#### 4.5. EEG et quantification de l'effet narcotique

L'analyse quantitative du signal EEG a permis d'évaluer le potentiel pharmacologique de certains psychotropes ainsi que leur relation PK-PD en vue d'optimiser les thérapies. En effet, les changements induits par ces drogues au niveau de l'EEG constituent un suivi pharmacodynamique idéal puisque les mesures sont continues, objectives, sensibles et reproductibles <sup>241</sup>.

C'est ainsi que le rebord spectral 95% a été utilisé pour modéliser les effets centraux du fentanyl, de l'alfentanil et du sufentanil chez l'Homme <sup>45,48</sup>. Les relations concentration-effet ont été quantifiées en utilisant un modèle de sigmoïde  $E_{max}$ . Il a été démontré que le fentanyl ( $t_{1/2}$   $k_{e0}$ =6,4 min) et le sufentanil ( $t_{1/2}$   $k_{e0}$ =6,2 min) s'équilibrent plus lentement que l'alfentanil ( $t_{1/2}$   $k_{e0}$ =1,1 min) avec le compartiment effet. Toutes les molécules ont présenté le même effet maximal mais leur  $EC_{50}$  variait entre 520 µg/L, 6,9 µg/L et 0,68 µg/L pour respectivement l'alfentanil, le fentanyl et le sufentanil.

Une étude a également comparé le profil pharmacodynamique du RMF, de son métabolite et de l'alfentanil chez des chiens anesthésiés à l'isoflurane. L'activité en delta et le rebord spectral 95% ont été employés pour le monitoring <sup>20</sup>. Cette étude a permis de déterminer que le RMF était environ 4500 fois plus puissant que son métabolite et seulement 8 fois plus que l'alfentanil. Le temps d'équilibre sang/cerveau était similaire pour le RMF et l'alfentanil (3,5 min) <sup>20</sup>.

S'il existe une bonne corrélation entre les changements du BIS et la probabilité de réponse à l'incision de la peau avec des agents tels que l'isoflurane et le propofol <sup>262,263,273</sup>, celle-ci devient moins significative en présence d'un opioïde. Au fur et à mesure que les concentrations plasmatiques de médicament augmentent on note une suppression des mouvements à l'incision de la peau sans qu'aucun changement significatif de la valeur du BIS n'ait lieu <sup>262</sup>. Ceci amène à distinguer entre les effets analgésiques et hypnotiques des opioïdes. Des observations suggèrent que les substrats neuronaux du mouvement en réponse à un stimulus nocicepteur serait distinct des générateurs corticaux de l'EEG <sup>274,275</sup>.



La suppression du mouvement semble davantage médiée par des actions spinales qui ne corrélaient pas toujours avec les effets sur l'EEG issu des fonctions corticales supérieures comme la perte de conscience ou la mémoire <sup>276</sup>. Par conséquent, la pertinence du monitoring par le BIS est mise en cause lors de l'utilisation d'un opioïde, si l'absence de mouvement à l'incision de la peau est utilisée pour définir l'efficacité. Ainsi, sous des conditions anesthésiques stables, le RMF n'affecte pas la valeur du BIS mais l'augmentation de celle-ci à la suite d'une stimulation nociceptive telle que l'intubation orotrachéale et la laryngoscopie est le signe d'une analgésie insuffisante <sup>277</sup>.



## 5. Modélisation PK-PD

Les événements survenant depuis l'administration d'un principe actif jusqu'à l'obtention de l'effet thérapeutique regroupent : la phase biopharmaceutique, au cours de laquelle le principe actif contenu dans le médicament est mis à disposition dans l'organisme; la phase pharmacocinétique qui correspond aux différents aspects (absorption, distribution, métabolisme et élimination) du devenir du principe actif dans l'organisme en fonction du temps; enfin, la phase pharmacodynamique qui implique l'interaction d'un principe actif et d'un récepteur entraînant l'effet thérapeutique recherché. Ce chapitre est consacré aux méthodes employées pour l'analyse pharmacocinétique des principes actifs et son application dans la modélisation PK-PD.

### 5.1. Analyse pharmacocinétique

La courbe concentration versus temps qui décrit le devenir du principe actif peut être simulée à l'aide d'équations mathématiques qui constituent le modèle pharmacocinétique et à partir duquel on calcule les paramètres pharmacocinétiques. Ceux-ci relatent la biodisponibilité du principe actif (coefficient de résorption, effet de premier passage), son niveau de distribution (taux de fixation protéique, volume de distribution), son métabolisme (clairance métabolique) et son élimination (clairance rénale, clairance totale, temps de demi-vie). Les paramètres pharmacocinétiques sont donc indispensables pour prédire la concentration de médicament dans le plasma et dans le tissu quel que soit le régime posologique, pour individualiser la dose optimale à administrer et pour estimer l'accumulation éventuelle du médicament ou des métabolites. De plus, ils permettent de relier les concentrations plasmatiques aux effets pharmacologiques ou toxiques. Les analyses pharmacocinétiques les plus courantes emploient des modèles non compartimentaux, compartimentaux et physiologiques.



### 5.1.1. Modèles non compartimentaux

La méthode d'analyse non compartimentale a initialement été introduite de manière générale par Yamaoka<sup>278</sup>; par la suite, Cutler et ses collaborateurs l'ont appliquée pour calculer un temps d'absorption moyen<sup>279</sup>. Elle repose sur la théorie des moments statistiques qui décrit des fonctions de probabilité de densité. En effet, on considère que la variation des concentrations plasmatiques d'un médicament, après une dose unique, décrit une courbe de distribution statistique. Le temps de séjour moyen dans l'organisme est alors calculé comme étant le rapport du premier moment statistique (AUMC) sur le moment zéro, qui représente l'aire sous la courbe de zéro à l'infini ( $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ ). Le principal avantage de cette méthode est qu'elle ne requiert aucune modélisation pour estimer des paramètres pharmacocinétiques tels que le volume de distribution à l'équilibre<sup>280</sup>, le temps de résidence moyen (TRM) dans l'organisme<sup>280,281</sup> et dans les tissus périphériques<sup>282-285</sup> et la clairance<sup>286</sup>. En revanche, elle nécessite des prélèvements sanguins fréquents et précis, puisque seules les données brutes sont utilisées et on ne lui attribue qu'un rôle purement descriptif.

### 5.1.2. Modèles compartimentaux ou déterministes

Les modèles pharmacocinétiques déterministes représentent l'organisme par un ou plusieurs compartiments qui regroupent un ensemble d'organes ayant à peu près le même débit sanguin et la même affinité pour un principe actif donné<sup>287,288</sup>. C'est une représentation simplifiée de la complexité de l'organisme, mais elle facilite l'écriture d'équations différentielles d'ordre premier qui décrivent le transfert du principe actif entre les compartiments. L'expression de la concentration plasmatique en fonction du temps ( $C_p=f(t)$ ) et les constantes de vitesses des divers aspects du devenir du principe actif dans l'organisme sont alors déterminées<sup>288</sup>. Sur la base de données expérimentales, l'analyse compartimentale s'effectue en partie au moyen de la méthode des résidus. De plus, des calculs de régression non linéaire permettent de préciser les valeurs des paramètres

pharmacocinétiques tout en minimisant la somme des carrés des écarts entre les concentrations mesurées et celles prédites par le modèle. Les modèles sont construits selon le principe de parcimonie qui privilégie le modèle le plus simple, et comprennent un, deux, parfois trois compartiments. Ils sont décrits pour différentes voies d'administration (intraveineuse, extravasculaire), en dose unique, continue ou répétée. Pour toutes les combinaisons possibles, les expressions mathématiques et graphiques de la concentration plasmatique en fonction du temps, ainsi que la résolution des paramètres pharmacocinétiques ont largement été décrites dans la littérature. Nous développerons, à titre d'exemple, les équations relatives à un modèle bicompartimental avec une perfusion.

#### **5.1.2.1. Modèle monocompartimental**

Lorsqu'un médicament est administré par la voie intraveineuse, il est directement accessible pour la distribution et l'élimination. Souvent, il se distribue rapidement au niveau tissulaire sans qu'il soit possible de distinguer une phase nette de distribution. Pour décrire la concentration plasmatique en fonction du temps, un modèle pharmacocinétique monocompartimental est utilisé, suivant lequel les changements des concentrations plasmatiques entraînent immédiatement un changement proportionnel des concentrations tissulaires.

#### **5.1.2.2. Modèle bicompartimental, résolution après une perfusion**

En général, les concentrations tissulaires ne sont pas les mêmes d'un tissu à l'autre et elles ne sont pas nécessairement égales aux concentrations plasmatiques. Elles dépendent de l'affinité du médicament pour les différents tissus et de l'irrigation sanguine au niveau de l'organe. En effet, les reins, le foie et les poumons sont très perfusés alors que le muscle, les os, les tissus cartilagineux et les graisses le sont beaucoup moins.

Dans un modèle bicompartimental, on suppose que les compartiments tissulaires où l'équilibre est obtenu très rapidement font partie du compartiment central, les autres représentant le compartiment périphérique. Ce modèle ne permet pas d'identifier les organes appartenant à l'un ou l'autre des compartiments, c'est uniquement un outil permettant d'expliquer le devenir du médicament dans l'organisme à partir des concentrations dans le compartiment de prélèvement et d'évaluer les paramètres liés à la distribution et à l'élimination.

Le déclin plasmatique de nombreux médicaments en fonction du temps est biexponentiel et peut être représenté par un modèle à deux compartiments. On a longtemps assumé que l'élimination avait lieu exclusivement à partir du compartiment central afin d'uniformiser l'approche de tous les auteurs<sup>289</sup>. En effet, les principaux sites responsables du métabolisme et de l'excrétion des médicaments (foie, reins, bile) étant bien perfusés, on peut aisément les assimiler au compartiment central. Ainsi, après une perfusion, les concentrations plasmatiques sont exprimées par l'équation biexponentielle suivante<sup>290</sup>:

$$C_p = \frac{k_0(k_{21} - \alpha)(1 - e^{-\alpha T})}{V_1 \alpha (\alpha - \beta)} e^{-\alpha t} + \frac{k_0(\beta - k_{21})(1 - e^{-\beta T})}{V_1 \beta (\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \quad \text{équation 1}$$

Où  $k_0$  représente la vitesse de perfusion,  $k_{21}$ , la constante de vitesse de transfert du compartiment 2 vers le compartiment 1,  $\alpha$  et  $\beta$ , les constantes hybrides des phases de distribution et d'élimination,  $V_1$ , le volume central de distribution et  $T$ , le temps de la perfusion. Cette équation générale décrit le devenir du principe actif dans le plasma pendant et après l'arrêt de la perfusion.

Pendant la perfusion l'équation se résume à<sup>290</sup>:

$$C_p = \frac{k_0}{V_1 k_{10}} \left( 1 + \frac{\beta - k_{10}}{\alpha - \beta} e^{-\alpha t} + \frac{k_{10} - \alpha}{\alpha - \beta} e^{-\beta t} \right) \quad \text{équation 2}$$

Où  $k_{10}$  représente la constante de la vitesse d'élimination à partir du compartiment central. La concentration plasmatique pendant la perfusion, augmente jusqu'à une valeur constante



à laquelle la clairance plasmatique équivaut à la vitesse de perfusion. Après 4 demi-vies, la concentration plasmatique atteint 90% de la concentration à l'équilibre et 99% après 7 demi-vies.

À l'arrêt de la perfusion l'équation générale devient <sup>290</sup>:

$$C_p = R e^{-\alpha t'} + S e^{-\beta t'} \quad \text{équation 3}$$

où  $t'$  représente le temps après l'arrêt de la perfusion. Les coefficients  $R$  et  $S$  sont reliés aux coefficients  $A$  et  $B$ . Ils représentent l'intersection avec l'axe des ordonnées à l'arrêt de la perfusion et s'expriment par:

$$R = \frac{k_0(\alpha - k_{21})(1 - e^{-\alpha T})}{V_1\alpha(\alpha - \beta)} \quad \text{équation 4}$$

$$S = \frac{k_0(k_{21} - \beta)(1 - e^{-\beta T})}{V_1\beta(\alpha - \beta)} \quad \text{équation 5}$$

Une fois que  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $R$  et  $S$  ont été déterminés  $A$  et  $B$  peuvent être calculés de la manière suivante <sup>290</sup>.

$$A = \frac{R X_0 \alpha}{k_0(1 - e^{-\alpha T})} \quad \text{équation 6}$$

$$B = \frac{S X_0 \beta}{k_0(1 - e^{-\beta T})} \quad \text{équation 7}$$

Où  $X_0$  représente la dose totale reçue. Ces équations sont très utiles, dans la mesure où les médicaments sont souvent administrés sous forme de perfusion à cause de leur faible solubilité ou de leurs effets secondaires (exemple du RMF). Si l'équilibre est atteint, les équations décrivant  $R$ ,  $S$   $A$  et  $B$  deviennent alors <sup>290</sup>:

$$R = \frac{k_0(\alpha - k_{21})}{V_1\alpha(\alpha - \beta)} \quad \text{équation 8}$$

$$S = \frac{k_0(k_{21} - \beta)}{V_1\beta(\alpha - \beta)} \quad \text{équation 9}$$

$$A = \frac{R X_0 \alpha}{k_0} \quad \text{équation 10}$$

$$B = \frac{S X_0 \beta}{k_0} \quad \text{équation 11}$$

Pour des molécules dont la demi-vie est longue, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre le compartiment central (sang) et les compartiments périphériques est long. On peut alors administrer une dose de charge afin d'obtenir immédiatement la concentration ciblée et tenter par la suite de la maintenir par une perfusion constante. La dose de charge (D) et la vitesse de perfusion sont calculées de la manière suivante<sup>290</sup> :

$$D = C_{ss} \times V_1 \quad \text{équation 12}$$

$$k_0 = C_{ss} \times V_1 \times k_{10} \quad \text{équation 13}$$

### 5.1.2.3. Équations généralisées pour les 3 types de modèles bicompartimentaux

En réalité, il existe trois types possibles de modèles bicompartimentaux, selon que l'élimination ait lieu à partir du compartiment central, du compartiment périphérique ou des deux simultanément (Fig. 25)<sup>288</sup>.

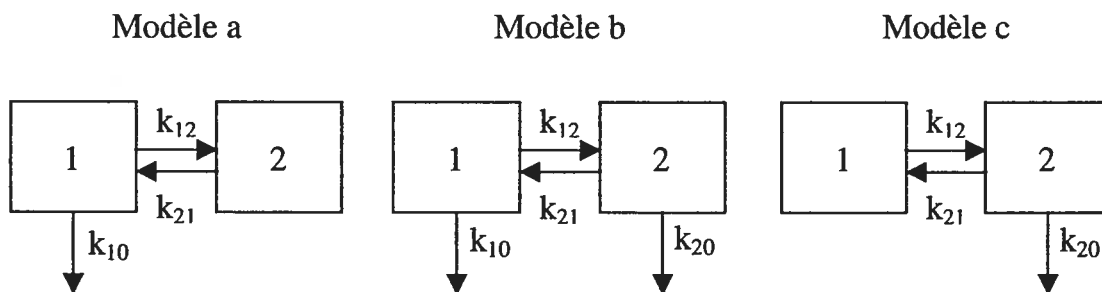


Figure 25. Les trois modèles pharmacocinétiques possibles à deux compartiments

Mathématiquement, les trois modèles mènent à une équation biexponentielle de type <sup>289</sup>:

$$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad \text{équation 14}$$

De plus, les mêmes approches sont employées pour dériver les relations entre les microconstantes  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{10}$ , et  $k_{20}$  et les constantes hybrides  $\alpha$ ,  $\beta$ , A et B.

La relation mathématique existant entre les constantes hybrides et les microconstantes est la suivante :

$$\alpha + \beta = E_1 + E_2 \quad \text{équation 15}$$

$E_1$  et  $E_2$  représentent la somme des constantes de vitesse sortant respectivement des compartiments central et périphérique. Leur valeur est indépendante du site d'élimination et demeure la même quel que soit le type de modèle choisi <sup>290</sup>. Par conséquent, si  $k_{20}$  augmente, les microconstantes de vitesse vont obligatoirement changer pour préserver la valeur de  $E_2$ .

Comme pour tous les modèles à deux compartiments, l'aire sous la courbe est exprimée par <sup>290</sup> :

$$AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \quad \text{équation 16}$$

Par ailleurs, des chercheurs ont généralisé les équations pour le calcul des paramètres pharmacocinétiques à partir de tous les modèles bicompartimentaux <sup>291,292</sup>. Certains d'entre eux ( $V_{dss}$ ,  $V_{d\beta}$ , TRM,  $X_{tot}$ ) dépendent du site d'élimination et par le fait même du type de modèle choisi <sup>292</sup>. En revanche, les paramètres tels que l'aire sous la courbe, le volume de distribution central et la clairance sont indépendants du site d'élimination <sup>292</sup>.

Le volume de distribution apparent est un paramètre pharmacocinétique qui relie proportionnellement la quantité de médicament dans l'organisme à la concentration observée dans le plasma à un temps donné. Il n'a aucune signification physiologique et peut

aussi bien être inférieur, égal ou supérieur à la masse corporelle. Ce dernier cas laisse toutefois supposer que le médicament s'accumule dans certains tissus pour lesquels il possède une affinité particulière. Le volume du compartiment central ( $V_1$ ) représente le volume occupé par la totalité du médicament immédiatement après l'injection. Il s'exprime par <sup>292</sup>:

$$V_1 = \frac{\text{Dose}}{A + B} \quad \text{équation 17}$$

La clairance plasmatique est définie comme étant le volume de plasma épuré du médicament par unité de temps. Sa valeur est indépendante du site d'élimination du fait qu'elle repose sur les concentrations observées <sup>292</sup>.

$$Cl = V_1 \left( k_{10} + \frac{k_{20} k_{12}}{E_2} \right) \quad \text{équation 18}$$

Au cours de la distribution, le volume apparent initial ( $V_1$ ) augmente progressivement <sup>293</sup>. Le volume de distribution à l'équilibre ( $V_{d_{ss}}$ ) représente le volume lorsque la quantité dans le compartiment 2 atteint sa valeur maximale au temps  $T_{max}$ . C'est une valeur ponctuelle si le médicament est administré sous forme de bolus. L'équation définissant le volume de distribution à l'équilibre dérivée par Riggs (1963) assumait une élimination du compartiment central exclusivement, son expression généralisée pour les trois modèles bicompartimentaux devient <sup>292</sup>:

$$V_{d_{ss}} = V_1 + V_2 = V_1 + V_1 \frac{k_{12}}{E_2} \quad \text{équation 19}$$

Où  $V_2$  représente le volume de distribution du compartiment périphérique.

Durant la phase d'élimination, lorsque l'équilibre de pseudodistribution est atteint (segment linéaire de la phase d'élimination), le volume de distribution apparent tend vers une valeur limite appelée  $V_{d\beta}$  <sup>293-295</sup>. Le volume de distribution à l'équilibre de pseudo-distribution



( $Vd_\beta$ ) relie donc la concentration plasmatique à la quantité de médicament présent dans l'organisme pendant la phase d'élimination. L'expression généralisée de son équation est la suivante <sup>292</sup>:

$$Vd_\beta = V_1 + V_2 = V_1 + V_1 \frac{k_{12}}{E_2 - \beta} \quad \text{équation 20}$$

La quantité de médicament dans le compartiment 2 ( $X_2$ ) est parfois utile à connaître, notamment lorsque les récepteurs pharmacologiques sont localisés dans les tissus périphériques <sup>296</sup>.

$$X_2 = \frac{k_{12} k_0}{\alpha (\beta - \alpha)} (1 - e^{-\alpha t}) e^{-\alpha t} + \frac{k_{12} k_0}{\beta (\alpha - \beta)} (1 - e^{-\beta t}) e^{-\beta t} \quad \text{équation 21}$$

En somme, les équations des paramètres pharmacocinétiques généralisées aux modèles de type a, b et c (Fig. 25) démontrent que  $Vd_{ss}$ ,  $Vd_\beta$  et  $X_2$  sont des paramètres qui dépendent du site d'élimination. Par conséquent, leur valeur sera différente selon le type de modèle retenu pour l'analyse <sup>292</sup>.

Même si les équations des paramètres pharmacocinétiques peuvent être dérivées pour les trois types de modèles bicompartimentaux, il n'en demeure pas moins que le modèle b n'est pas identifiable et les solutions possibles pour les valeurs des quatre microconstantes ( $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ,  $k_{10}$  et  $k_{20}$ ) sont infinies <sup>290</sup>. En effet, dans tous les modèles déterministes le nombre maximal de constante de vitesse résoluble Z, est donné par <sup>290</sup> :

$$Z = 2(N - 1) + 1 \quad \text{équation 22}$$

Où N représente le nombre de compartiments. Par conséquent, pour un modèle à deux compartiments, seulement trois constantes de transfert peuvent avoir des solutions uniques. De plus, aucune constante de transfert ne peut être calculée de manière indépendante <sup>290</sup>.

#### 5.1.2.4. Concept d'élimination périphérique

Certains nouveaux médicaments développés en anesthésie subissent une hydrolyse enzymatique (mivacurium, RMF, atracurium) ou chimique (atracurium, cis-atracurium) indépendante des principaux organes d'élimination<sup>297</sup>. Celle-ci peut avoir lieu aussi bien dans le compartiment central que dans le compartiment périphérique. Il a été précédemment démontré que des modèles pharmacocinétiques traditionnels, assumant une élimination centrale (modèle a), ne sont pas adaptés pour décrire le profil pharmacocinétique de ces nouvelles molécules et conduisent à une sous-estimation des paramètres dépendants du site d'élimination comme le volume de distribution à l'équilibre et le volume de distribution à l'équilibre de pseudo-distribution<sup>292</sup>. L'incidence clinique est importante si l'on considère que le volume de distribution à l'équilibre sert à calculer les doses de charge. Le modèle bicompartimental assumant une élimination à la fois des compartiments central et périphérique, a alors été introduit par Ward et ses collaborateurs (modèle b). Cependant, comme on l'a vu précédemment, ce modèle n'est pas identifiable et l'estimation des paramètres dépendants du site d'élimination par le calcul des aires sous la courbe est, dans ce cas, erroné<sup>298</sup>. Ainsi, pour contourner ce problème, Fisher et ses collaborateurs ont suggéré de fixer la constante d'élimination du compartiment périphérique à celle obtenue suite à des incubations *in vitro* dans le plasma ( $k_{20}=k_{in\ vitro}$ )<sup>299</sup>. En l'absence de données *in vitro* pour un patient donné, on peut aussi avoir recours, avec prudence, aux valeurs de la littérature<sup>300-303</sup>. Bien que judicieuse, cette approche n'est pas valable pour des molécules dont l'hydrolyse est enzymatique<sup>297</sup>. En effet, l'activité enzymatique dans le plasma ne représente pas toujours celle à la périphérie de par la nature même des enzymes et leur distribution<sup>304-306</sup>. Enfin, une autre approche consiste à fixer  $k_{20}=\beta$ , lorsqu'il a été démontré que la pente d'élimination *in vivo* est similaire à la valeur de  $k_{in\ vitro}$  (atracurium, succinylcholine)<sup>307</sup>.

L'approche tenant compte de l'élimination périphérique corrige l'estimé des paramètres qui dépendent du site d'élimination. Néanmoins, en dehors du fait



que la valeur attribuée à  $k_{20}$  n'est pas toujours évidente, ce modèle conduit à d'importantes aberrations. En effet, quelle que soit la valeur de  $k_{20}$ , la concentration dans le compartiment périphérique demeure inchangée <sup>1</sup>! Ce résultat provient du fait que les volumes de distribution employés pour calculer les concentrations périphériques sont dérivés en assumant un état d'équilibre entre les concentrations centrale et périphérique. Il constitue alors la principale limite de ce modèle et remet en question sa pertinence physiologique <sup>1</sup>.

### 5.1.3. Modèles physiologiques

Les compartiments, dans une analyse pharmacocinétique déterministe, représentent des boîtes noires qui ne renvoient pas à des entités anatomiques. Ainsi, le modèle ne permet pas de calculer la concentration du principe actif dans un organe ou un tissu donné. En 1968, Bishoff et Dedrick ont introduit le modèle physiologique en pharmacocinétique <sup>308</sup>. En se basant sur les caractéristiques anatomiques et physiologiques des organes (taille, débit sanguin, perméabilité membranaire, clairance métabolique) ainsi que sur les caractéristiques physico-chimiques du principe actif, il est possible d'élaborer un modèle pharmacocinétique physiologique comprenant autant de compartiments qu'il y a d'organes recevant le principe actif. Pour le simplifier on peut également regrouper les tissus ayant à peu près le même débit sanguin et la même affinité pour une molécule donnée <sup>308</sup>. Ce modèle donne une idée plus précise du devenir du médicament dans l'organisme, permet de mieux déceler les variables physiopathologiques susceptibles de modifier la pharmacocinétique du principe actif et facilite grandement la transposition à l'Homme de données issues de l'expérimentation animales. En effet, les masses de différents organes, la liaison aux protéines, la capacité métabolique, et le débit sanguin chez l'Homme et chez les autres espèces animales sont souvent bien documentés <sup>309</sup>.

Les modèles compartimentaux et physiologiques ont l'avantage de pouvoir inclure des processus non linéaires et d'être par le fait même, plus complexes <sup>309</sup>. Les modèles physiologiques ont la particularité de pouvoir représenter des compartiments qui



conservent chacun un rôle physiologique distinct. De plus, ils peuvent être connectés par une voie nerveuse ou humorale pour moduler les réponses dans une région donnée <sup>309</sup>. Enfin, ces modèles peuvent tenir compte de changements dans les conditions expérimentales initiales comme le débit sanguin pendant l'anesthésie, le rythme circadien ou l'activité enzymatique <sup>309</sup>. Toutefois, les informations nécessaires pour construire ce type de modèle ne sont pas facilement accessibles, ce qui en limite beaucoup l'utilisation.

Peu importe l'approche retenue (non compartimentale, compartimentale, ou physiologique), les paramètres calculés sont similaires si les modèles choisis sont adéquats <sup>292</sup>.

## 5.2. Analyse de la relation dose-effet

Les modèles pharmacocinétiques décrivent l'évolution de la concentration plasmatique en fonction du temps et de la dose. Les modèles pharmacodynamiques sont indépendants du temps, ils décrivent la relation entre la concentration et l'effet. L'estimation des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques d'un principe actif vise à caractériser la relation entre la dose et l'intensité de l'effet thérapeutique ou toxique, en vue d'établir des schémas posologiques rationnels. La concentration représente le terme qui relie ces deux modèles pour décrire l'ensemble de la relation dose-effet. Cependant, la pharmacodynamie réfère aux concentrations de médicament au niveau du site d'action. Celles-ci ne pouvant être directement estimées par des modèles pharmacocinétiques, des modèles de liaisons PK-PD ont alors été introduits.



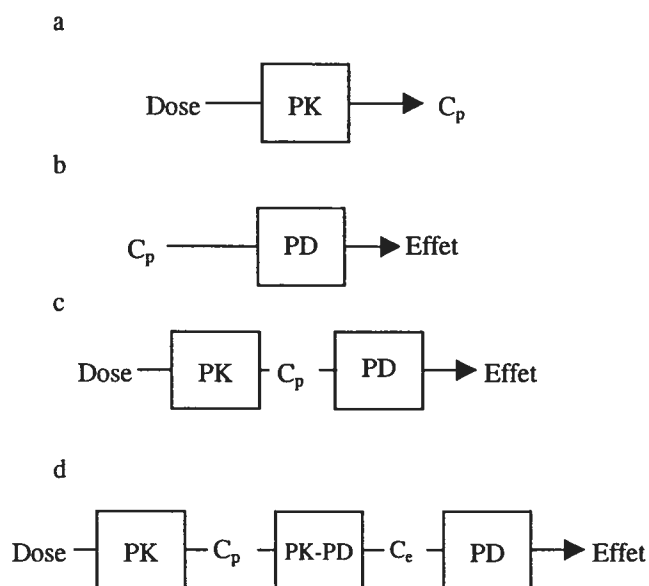


Figure 26. Représentation schématique de la PK (a), de la PD (b), de la relation dose-effet (c) et du PK-PD (d)

## 5.2.1. Modèles pharmacodynamiques

### 5.2.1.1. Effet fixe

Ce modèle associe la concentration du médicament à une réponse de type « tout ou rien »<sup>287</sup>. Il est possible de mesurer l'évolution de la fréquence d'une telle réponse dans une population d'individus, en fonction d'une fourchette de concentrations sanguines ou plasmatiques. De façon empirique, on observe souvent une distribution normale de la fréquence en fonction du logarithme décimal de la concentration<sup>287,310</sup>.

### 5.2.1.2. Modèle $E_{\max}$

C'est le modèle le plus simple décrivant l'effet d'un médicament en fonction de la concentration <sup>287</sup>. Il est représenté par une fonction hyperbole:

$$E = \frac{E_{\max}C}{EC_{50} + C} \quad \text{équation 23}$$

Où E représente l'effet du médicament, C, la concentration et  $EC_{50}$ , la concentration produisant 50% de l'effet maximal. Ce modèle a surtout été utilisé pour décrire les cinétiques enzymatiques (Michaelis Menten) ou de liaisons aux protéines <sup>287,311</sup>.

### 5.2.1.3. Modèle linéaire

Si les concentrations de médicaments sont faibles par rapport à la  $EC_{50}$ , l'effet est alors directement proportionnel à la concentration <sup>287</sup> :

$$E = S \times C \quad \text{équation 24}$$

Où S représente la pente de la droite. Sa valeur tend vers le rapport :  $E_{\max}/EC_{50}$ . Ce modèle dérivé du précédent ne permet pas de définir un effet maximal. Il se limite à une description empirique de l'effet en fonction de la concentration.

### 5.2.1.4. Modèle sigmoïde $E_{\max}$

Hill a noté lors de ses études sur la saturation de l'hémoglobine par l'oxygène, que la courbe concentration-effet de plusieurs médicaments n'était pas représentée par une hyperbole <sup>287</sup>. L'équation qu'il suggère et qui porte son nom s'écrit :

$$E = \frac{E_{\max}C^y}{EC_{50}^y + C^y} \quad \text{équation 25}$$

Où  $\gamma$  représente le nombre qui influence la pente de la sigmoïde. Lorsque  $\gamma=1$  on retrouve le modèle  $E_{\max}$  traditionnel. Si  $\gamma$  est supérieur à 1, la courbe représente une sigmoïde dont la partie linéaire est abrupte. L'effet inverse est observé si  $\gamma$  est inférieur à 1. Ainsi,  $\gamma$  décrit uniquement l'allure générale de la sigmoïde et ne représente en aucun cas le nombre de sites de fixation disponibles sur le récepteur <sup>287</sup>.

Chacune des équations décrivant ces trois modèles peuvent être adaptées de façon à inclure un effet de base au temps zéro <sup>312,313</sup>, un effet relatif au signal de base ou une inhibition de celui-ci <sup>287,314</sup>.

#### 5.2.1.5. Modèle Log-linéaire

Ce modèle est une approximation linéaire du modèle  $E_{\max}$  dans la portion de la courbe comprise entre 20 et 80% de l'effet maximal <sup>287</sup>.

$$E = S \times \log C + A \quad \text{équation 26}$$

Où A est une constante arbitraire qui n'a pas de signification physiologique. Une régression linéaire simple permet de décrire la pente de la droite et les tests statistiques évaluant l'influence d'une autre drogue (agoniste ou antagoniste). Cependant, comme ce modèle ne permet pas de définir l'effet maximal il est impossible de s'assurer que la réponse observée est bien comprise entre 20 et 80% de  $E_{\max}$ . Cette approche, tolérée avant l'apparition des méthodes de régression non linéaire, n'est désormais plus recommandée <sup>287</sup>.

## 5.2.2. Analyse PK-PD

### 5.2.2.1. Modèle PK-PD paramétrique

Ces modèles consistent à relier les modèles pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pour décrire la réponse pharmacologique en fonction du temps. La méthode la plus simple consiste à relier les effets en fonction des concentrations plasmatiques <sup>315</sup>. Ce modèle assume que la biophase est localisée dans le compartiment central et que la réponse pharmacologique est en tout temps directement proportionnelle à la concentration du principe actif dans le plasma. Or, souvent, le lien entre les concentrations plasmatiques et l'effet observé n'est pas direct et on observe un phénomène d'hystérèse qui se traduit par un délai entre les concentrations sanguines et l'apparition de la réponse pharmacologique. Le délai observé peut être évité si les études de PK-PD sont effectuées dans des conditions d'équilibre. Une autre approche consiste à construire un modèle PK-PD capable d'en tenir compte.

Dans cette optique, les concentrations dans les tissus périphériques ( $C_2$ ), simulées à partir du modèle pharmacocinétique, ont été reliées à l'effet observé <sup>316-318</sup>. Même si cette approche s'est parfois avérée valable, elle est soumise à certaines réserves. En effet, il n'y a, *a priori*, aucune raison de penser que les concentrations périphériques reflètent celles de la biophase <sup>312</sup>. D'une part, le compartiment effet ne reçoit qu'une infime quantité de médicament n'ayant aucune conséquence sur le modèle pharmacocinétique. D'autre part, les estimés des concentrations périphériques dans un modèle multicompartimental sont associés à un niveau d'erreur élevé. Enfin, cette approche n'est valable que pour un modèle pharmacocinétique à plusieurs compartiments, alors qu'on observe couramment un délai d'équilibre avec des médicaments dont la cinétique présente un profil monocompartimental <sup>319</sup>.

Une approche élégante pour tenir compte du délai s'écoulant entre l'apparition de l'effet et l'évolution de la concentration plasmatique a été développée par Sheiner et ses collaborateurs <sup>320</sup>. Elle consiste à considérer un compartiment virtuel

(compartiment effet) dans lequel la concentration est directement en équilibre avec l'effet pharmacologique mesuré. Les compartiments effet et plasmatique sont reliés entre eux par une fonction particulière. Celle-ci consiste à décrire une relation continue entre les deux compartiments, et faire en sorte qu'à une concentration simulée dans le compartiment effet corresponde une seule intensité de l'effet, quel que soit le moment de la mesure. Dans ce modèle, l'entrée et la sortie de la substance du compartiment effet sont des processus d'ordre un. De façon à ne pas modifier la concentration dans le compartiment central, on assume que le transfert de masse est négligeable par rapport à toutes les autres constantes de transfert du modèle, ce qui revient à dire que le compartiment effet a un volume de distribution négligeable. Ainsi, comme la quantité de médicament qui entre dans le compartiment effet est négligeable celle qui retourne dans le compartiment central l'est aussi. Par conséquent,  $k_{e0}$  peut être représenté sans grande conséquence comme sortant du compartiment effet ce qui évite d'ajouter un terme exponentiel à l'équation cinétique. En admettant ce postulat, il est possible de démontrer que la valeur de la constante  $k_{1e}$  ne revêt guère d'importance. Par contre, la valeur de la constante de vitesse d'élimination à partir du compartiment effet,  $k_{e0}$ , correspond exactement au temps nécessaire pour obtenir l'équilibre entre l'effet pharmacologique mesuré et la concentration plasmatique. À partir de cette approche, l'équation décrivant l'évolution de l'effet en fonction du temps est <sup>320</sup> :

$$\frac{dC_e}{dt} = k_{1e}C_1 - k_{e0}C_e \quad \text{équation 27}$$

Ce qui donne après intégration <sup>320</sup> :

$$C_e = \frac{k_{e0}X_0}{V_1} \left[ \left( \frac{k_{21} - \alpha}{(\beta - \alpha)(k_{e0} - \alpha)} e^{-\alpha t} \right) + \left( \frac{k_{21} - \beta}{(\alpha - \beta)(k_{e0} - \beta)} e^{-\beta t} \right) + \left( \frac{k_{21} - k_{e0}}{(\alpha - k_{e0})(\beta - k_{e0})} e^{-k_{e0}t} \right) \right] \quad \text{équation 28}$$

Le terme  $C_e$  est ensuite substitué dans l'équation du modèle pharmacodynamique choisi pour estimer les 4 paramètres:  $E_{\max}$ ,  $\gamma$ ,  $EC_{50}$  et  $k_{e0}$ . Un programme de régression non linéaire permet de fixer d'abord le modèle pharmacocinétique puis d'utiliser les paramètres dérivés dans le modèle pharmacodynamique <sup>287</sup>, ou encore, de fixer les deux modèles

pharmacocinétique et pharmacodynamique simultanément<sup>320</sup>. La valeur de  $k_{e0}$  dépend de la perfusion du site d'action, de la vitesse de diffusion à partir des capillaires, de la distribution sang/tissu, de la constante d'association et de dissociation avec le récepteur et du temps requis pour déclencher la réponse pharmacologique<sup>287</sup>.

#### 5.2.2.2. Modèle PK-PD semi-paramétrique et non-paramétrique

Dans le modèle PK-PD précédent on fait plusieurs suppositions concernant la structure de modèles qui ne reflètent pas forcément la réalité. Une approche semi-paramétrique a alors été proposée pour l'analyse pharmacodynamique des données<sup>321</sup>. Cette méthode estime la valeur de  $k_{e0}$  qui va «collapser» les deux branches de l'hystérèse décrivant la relation concentration-effet. Cette procédure consiste à minimiser l'écart entre les deux branches, de sorte qu'une seule mesure de l'effet soit associée à une valeur donnée de  $C_e$ , sans avoir à spécifier un modèle pharmacodynamique quelconque. Cette méthode fut ensuite étendue à une approche non paramétrique à la fois pour le modèle pharmacocinétique et pharmacodynamique<sup>322</sup>. Certaines suppositions demeurent toutefois nécessaires au sujet du modèle de liaison entre le compartiment central et le compartiment effet. Cette approche peut être utile pour faciliter le choix d'un modèle pharmacodynamique ou lorsque les données pharmacocinétiques sont difficiles à caractériser.



## 6. Objectifs

À la lumière de cette revue de littérature, les objectifs de mon projet de recherche se dessinent autour des points suivants :

- Développer une méthode analytique pour le dosage du RMF et de son métabolite dans une matrice plasmatique qui assurera une meilleure corrélation entre les concentrations mesurées et l'effet observé.
- Effectuer une étude PK-PD du RMF sur un modèle animal, le chien, dont l'activité estérasique est semblable à celle de l'Homme.
- Caractériser l'équilibre de distribution du RMF :
  - Comparer les concentrations mesurées au niveau de l'artère fémorale, la veine jugulaire et le liquide céphalorachidien, aux concentrations dérivées dans le compartiment effet, à l'équilibre.
  - Comparer les concentrations mesurées au niveau de l'artère fémorale, la veine fémorale et du liquide interstitiel musculaire échantillonné par microdialyse, aux concentrations dérivées dans le compartiment périphérique, à l'équilibre.
- Évaluer l'impact de l'extraction tissulaire, sur l'estimation des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du RMF.



**CHAPITRE 2**  
**MANUSCRITS**



**1. Simultaneous solid-phase extraction combined to HPLC with UV detection for the determination of remifentanil and its metabolite in dog plasma** [*Journal of Chromatography B* **783**: 103-111 (2002)]

By

Meriam Kabbaj<sup>1</sup>

France Varin<sup>1</sup>

1. Faculté de pharmacie  
Université de Montréal

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MA10274). A Canadian Institutes of Health Research-Research and development studentship was awarded to M.K. Remifentanil was provided by Abbott Laboratories.

Acknowledgment. The authors would like to thank Johanne Couture for her technical support.



### 1.1. Abstract

To establish pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships, a selective and specific high performance liquid chromatographic method was developed for the quantitation of remifentanyl and its metabolite in dog plasma. The assay involves a solid-phase extraction and a reverse phase chromatographic separation with ultraviolet detection ( $\lambda = 210$  nm). The calibration curves are linear in the range of 7.89 – 1500 ng.mL<sup>-1</sup>. Intra-day assay variability is less than 7% for all standards evaluated. Good recovery, linearity, accuracy, and precision were achieved with the assay that proved readily applicable to pharmacokinetic studies in dogs.

**Keywords:** *Remifentanyl; GI90291; HPLC; dog plasma*



## 1.2. Introduction

Remifentanyl, methyl-3-[4-methoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)-phenylamino]-1-piperidine]-propanoate (GI87084B), is an ultra-short acting  $\mu$ -opioid anaesthetic agent of the fentanyl class with potent analgesic activity (Fig.1). It has an in vivo elimination half-life of 9 min in patients [1] which is much shorter than that of fentanyl, sufentanil and alfentanil (219, 164, and 94 min, respectively) [2]. Remifentanyl is used extensively for short-term anaesthesia, often in combination with sedatives [3]. Its labile methyl propanoate ester linkage is sensitive to enzymatic and chemical hydrolysis and rapidly forms the corresponding carboxylic acid (GI90291). This acidic metabolite has only 1/4500 the potency of the parent compound in animal models [4] and will be referred to as demethoxy-remifentanyl. N-dealkylation of remifentanyl (GI94219) is a minor metabolic pathway in humans (Fig. 1).

Several analytical methods have been developed to quantitate remifentanyl either alone or simultaneously with its major metabolite in whole blood. Among the methods are gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [5;6], HPLC [7;8], as well as tandem mass spectrometry [9]. In these methods, extraction procedures are mostly based on liquid extractions and are therefore time consuming. In addition, the only solid-phase extraction method reported does not allow the simultaneous extraction of both remifentanyl and its major metabolite [4]. Considering the low potency of demethoxy-remifentanyl, its contribution to the analgesic effect is not of pharmacological interest. However, in view of the importance of this metabolic pathway its determination will help understanding remifentanyl body disposition.

Rapid hydrolysis of remifentanyl in blood has always been a key argument for choosing this matrix for remifentanyl analysis, avoiding the time needed to harvest plasma [7]. As the plasma free fraction is responsible for the pharmacological effect, quantitation of remifentanyl in plasma instead of whole blood would appear preferable when establishing concentration-effect relationships. In addition, remifentanyl hydrolysis in whole blood is attributed to non-specific red blood cell esterases [10] whereas plasma pseudo-

cholinesterases are not involved [11]. For both these reasons, it seemed more appropriate to develop an analytical method to quantitate remifentanyl in plasma.

The primary objective of this study was to develop a single procedure based on solid-phase extraction for the rapid determination of both remifentanyl and its major metabolite in plasma. For that purpose, stability studies were conducted to document the ex vivo rate of degradation of remifentanyl in whole blood. Finally, the applicability of the method to pharmacokinetic studies was verified, using the dog as an animal model.



### 1.3. Experimental

#### 1.3.1. Materials

Remifentanil hydrochloride, demethoxy-remifentanil, and the internal standard (I.S.) (GI95779) were kindly provided by Glaxo-Wellcome Inc. (Stevenage, Hertfordshire, UK). Citric acid was purchased from ACP chemicals Inc. Potassium phosphate monobasic was obtained from American Chemicals LTD. (Montreal, Québec, Canada). Concentrated phosphoric acid and potassium phosphate dibasic were purchased from Fisher Scientific (Montréal, Québec, Canada). Acetonitrile and methanol were purchased from Anachemia Canada Inc. (Montréal, Québec, Canada). All solvents were of HPLC grade, and all other chemicals were of analytical grade.

#### 1.3.2. Instrumentation

The HPLC system consisted of a Constametric® 4100 pump, a Spectrasystem® autosampler (Thermo Separation Products Inc., Riviera Beach, FL) and a variable wavelength SM4000 UV detector set at 210 nm (Milton Roy LDC Division, Riviera Beach, FL). Peak integration was performed using the Star Chromatography Varian Software version 4.51 (Walnut Creek, CA). Separation of remifentanil and its metabolite was performed on a 5- $\mu$ m reverse phase Spherisorb C1 column (150 x 4.6 mm I.D.), equipped with a C1 guard column (4 x 3 mm I.D.), both purchased from Phenomenex Inc. (Torrance, CA) and preceded by a 0.45- $\mu$ m in-line filter (State College, PA). The solvent flow rate was set at 1.5 mL.min<sup>-1</sup> with a resulting backpressure of 1700 psi. The chromatographic system was operated at room temperature (22°C).



### 1.3.3. Mobile phase

The potassium phosphate buffer (50 mM) component of the mobile phase was prepared with deionised water and the pH was adjusted to 3 using concentrated phosphoric acid. The mobile phase was prepared daily by adding 180 mL of acetonitrile, 120 mL of methanol and 48 mL of phosphate buffer into 1 L volumetric flask. The flask was then completed to volume with water. The solution was stirred and filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  nylon filter (Millipore, Waters Assoc., Milford, MA).

### 1.3.4. Standard solutions

Pure standard stock solutions of remifentanil and demethoxy-remifentanil (1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) were prepared in 50 mM phosphate buffer (pH 3) and stored at 4°C. Working solutions (100,000  $\text{ng.mL}^{-1}$  and 10,000  $\text{ng.mL}^{-1}$ ) were made by further dilution in the same buffer.

A standard stock solution of the internal standard (1  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) was prepared in phosphate buffer (pH 3) and further diluted in the same medium to yield the working solutions (100,000  $\text{ng.mL}^{-1}$  and 800  $\text{ng.mL}^{-1}$ ).

### 1.3.5. Remifentanil *ex vivo* stability in blood

Fresh dog blood aliquots (20 mL) were spiked with remifentanil at a concentration of 1000  $\text{ng.mL}^{-1}$  and were kept on ice for 15 min. Each aliquot was previously neutralized with 5  $\text{mg.mL}^{-1}$  of citric acid and / or 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of echothiophate, and was kept on ice for four hours. A control aliquot containing neither citric acid nor echothiophate was prepared. Samples were collected at 0, 30, 120 and 240 min, centrifuged (2000 g for 15 min) and stored at -70°C until analysis. Control samples and samples containing echothiophate were acidified with citric acid (5  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) prior to storage.



To test the ex vivo stability, a fresh dog blood aliquot (20 mL) previously maintained at 37°C was spiked with remifentanyl at a concentration of 1000 ng.mL<sup>-1</sup>. The aliquot was immediately placed on ice and the temperature was measured regularly. Blood samples were collected and treated as described above.

### 1.3.6. Calibration curves

Blank dog plasma from dogs used for the preparation of standards and quality control samples (QCs) contained citric acid (5 mg.mL<sup>-1</sup>, pH 5) to prevent the degradation of remifentanyl. Remifentanyl and demethoxy-remifentanyl solutions at concentrations of 10,000 ng.mL<sup>-1</sup> and 100,000 ng.mL<sup>-1</sup> were used as working solutions. Appropriate volumes of the working solutions were added to stabilized plasma to yield both standards of 1500 and 1000 ng.mL<sup>-1</sup>. The pool of plasma containing 1000 ng.mL<sup>-1</sup> of each analyte was then serially diluted (1:1) with drug-free plasma to yield plasma standards containing remifentanyl and demethoxy-remifentanyl at the following final concentrations: 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.89 ng.mL<sup>-1</sup>. Very low, low, medium, and high QCs containing remifentanyl and its metabolite at concentrations of 20, 40, 200 and 1250 ng.mL<sup>-1</sup>, respectively, were prepared. Following a bolus dose of 5 mg.kg<sup>-1</sup> of remifentanyl in vivo, plasma concentrations are expected to rise well above 1500 ng.mL<sup>-1</sup> after. Therefore, the technique used to dilute the samples was validated. QC samples at concentrations of 10,000 ng.mL<sup>-1</sup> were diluted 1:10 and were analysed for precision and accuracy. After mixing, 0.7 mL aliquots of standards and QCs were dispensed into polypropylene tubes and stored at -70°C until analysis.

### 1.3.7. Extraction procedure

Plasma samples, standards and QCs were allowed to thaw at room temperature. All samples were centrifuged at 4°C (2000 g for 15 min) prior to



manipulation. Bond Elut® phenyl solid-phase extraction cartridges (Varian, Harbour City, CA) were used for the extraction of remifentanyl and its metabolite. GI95779 (120 ng.mL<sup>-1</sup> plasma) was used as internal standard. The cartridges were conditioned with a sequence of methanol (1 mL) and phosphate buffer pH 3 (1mL). Volumes of 0.5 mL of plasma and 0.75 mL of the I.S. (800 ng.mL<sup>-1</sup>) were sequentially added to the cartridges and allowed to be adsorbed on the column packing before applying the vacuum. For the highest plasma concentration, samples (50 µL) were diluted 1:10 with blank plasma (450 µL) directly onto the solid-phase extraction cartridges. The cartridges were then washed successively with 1 mL of phosphate buffer pH 3 and 1 mL of acetonitrile under a weak vacuum (≤50 kPa). Finally, the analytes were eluted with 1 mL of methanol into glass tubes. The eluent was evaporated to dryness using a Speed-Vac concentrator (Model SC210A, Savant Instruments, Farmingdale, NY). The dry residues were reconstituted in 0.2 mL of mobile phase. Volumes of 50-100 µL were injected into the chromatographic system.

### **1.3.8. Assay validation**

#### **1.3.8.1. Recovery**

The recovery of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl from plasma was evaluated in quadruplicate at two different drug concentrations (40 and 1250 ng.mL<sup>-1</sup>). Blank plasma spiked with known amounts of analytes and 0.75 mL of I.S. (800 ng.mL<sup>-1</sup>) was extracted and compared with blank plasma and I.S. extracts subsequently spiked with the same amounts of analytes. The two sets of extracts were then evaporated to dryness using the Speed-Vac system and reconstituted in mobile phase. The recovery was assessed by comparing the analyte / I.S. peak-height ratios for both sets of extracts.



### 1.3.8.2. Linearity and limit of quantitation

Calibration curves were generated from the nine standards using remifentanil or GR90291 / I.S. peak-height ratio. Linearity was assessed by weighted least square regression ( $1/x^2_{\text{observed}}$ ) of the analyte / internal standard peak-height ratio against standard concentration.

The limit of quantitation was defined as the lowest plasma concentration of the standard curve. In order to estimate the lower limit of detection at a signal-to-noise ratio of 5, a  $1000 \text{ ng.mL}^{-1}$  solution of remifentanil and its metabolite was serially diluted in the mobile phase.

### 1.3.8.3. Reproducibility

Inter-assay precision and accuracy were determined using QC samples spiked with four different concentrations of remifentanil. The concentrations used were, 20, 40, 200 and  $1250 \text{ ng.mL}^{-1}$  for the very low, low, medium, and high levels of the calibration range, respectively. Two replicates of each QC concentration were assayed over 6 consecutive days. The QC concentrations were determined from 6 different calibration curves which were run along with the QC samples. Precision was expressed as the percent of variation (% CV) and accuracy was measured as the percent of bias.

Intra-assay precision and accuracy were determined in the same manner as the inter-assay, except that four replicates of each QC concentration (very low, low, medium, and high) were assayed. Their corresponding back-calculated concentrations were extrapolated from a single calibration curve which was run on the same day.

Inter-assay and intra-assay precision and accuracy were determined similarly for demethoxy-remifentanil at three different concentrations: 40, 200 and  $1250 \text{ ng.mL}^{-1}$  for the low, medium and high QC, respectively.



#### 1.3.8.4. Statistical analysis

Statistical analysis includes calculation of the mean, standard deviation, coefficient of variation (% precision) and percent bias (% accuracy) for the QC samples. The mean standard deviation and coefficient of variation are also calculated for the slope (m), intercept (b) and coefficient of determination ( $r^2$ ) obtained from each curve.

#### 1.3.9. Pharmacokinetic study

The plasma concentration-time profile of remifentanil was determined after administration of a  $4.4 \text{ mg.kg}^{-1}$  iv dose of the drug in an anesthetized dog. Arterial blood samples (3 mL) were collected prior to remifentanil administration and then at 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 80, 100 and 120 min post dose in tubes containing 20 units of heparine and 30  $\mu\text{L}$  of citric acid (50%). Samples were kept in an ice-water bath for less than 1h before centrifugation. Centrifugation was applied at 2000 g for 15 min and the plasma was immediately stored at  $-70^\circ\text{C}$  until analysis.



#### 1.4. Results and discussion

Remifentanil's poor stability has always been an argument put forth against choosing whole blood as the assay matrix. It was considered that the time required for plasma separation from whole blood prolonged exposure of the ester to conditions favouring hydrolysis. However, in pharmacokinetic / pharmacodynamic relationship studies, we usually consider that only plasma concentrations are accessible to the bio-phase.

In order to develop an analytical method using plasma as the biological matrix, we first tested the ex vivo stability of remifentanil in fresh blood to ensure adequate handling of samples and optimal conditions for the assay. Blood aliquots were kept on ice and contained either citric acid, echothiophate, or both stabilizing agents. The citric acid concentration required for stabilisation was found to be two-fold lower than previously recommended [7]. At higher concentrations of citric acid ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), blood hemolysis resulted in plasma contamination by red blood cell constituents or active non-specific esterases. It was previously shown that human blood samples preserved with citric acid ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) could be safely stored on ice for 20 h, although for some reason this time interval was considered too short for adequate sample handling [7]. Our results show that remifentanil is stable for up to four hours when kept on ice either in the presence of a stabilizing agent or not (Table 1). Citric acid or an esterase inhibitor like echothiophate are therefore not required to maintain remifentanil integrity when samples are kept on ice for at least 4 hours, which, in our opinion, allows enough time to separate plasma from blood. The ex vivo remifentanil stability was also tested by spiking a blood aliquot pre-equilibrated at  $37^{\circ}\text{C}$  with remifentanil and subsequently placing it on ice. Approximately 20 min were required for the sample to cool down to  $5^{\circ}\text{C}$ , which did not alter remifentanil integrity (Table 1). In contrast to other methods, I.S. stability was not a concern because plasma samples were only acidified and frozen as such.

Since most of the procedures described for remifentanil and demethoxy-remifentanil extraction were based on liquid / liquid extractions, we first attempted to find an organic solvent that would show a great affinity for both compounds. Several studies described



remifentanil extraction from blood using of n-butyl chloride followed by a back extraction in HCl 0.01M for [7]. The recovery of remifentanil by this method was shown over 88 %, however the major metabolite could not be extracted under these conditions. We therefore tried methylene chloride, a more polar solvent commonly used for the simultaneous extraction of remifentanil and demethoxy-remifentanil [5;6] but the recovery of the metabolite was also found to be low (50%). We then tried solid-phase extraction of the analytes from plasma. Hoke and his co-workers used C-8 cartridges for the solid-phase extraction of remifentanil from blood and demethoxy-remifentanil from plasma [4]. With this procedure, washing with acetonitrile resulted in a very low recovery of remifentanil and its metabolite. Since a final wash with an organic solvent was deemed necessary to maintain a clean chromatographic separation (essentially between the demethoxy-remifentanil and the solvent front), we considered the use of columns having more polar functional groups i.e. C-1 and C-phenyl. Both supports provided an excellent compromise between retention and elution parameters, but the latter yielded cleaner plasma extracts. Under these conditions, the recovery of remifentanil was complete (106% - 101%) and reproducible (C.V. under 8%) for both concentrations (40 and 1250 ng.mL<sup>-1</sup>) (Table 2). Although a lower recovery was obtained for the metabolite (Table 2), it was quite acceptable (76.8 - 80.0%) and reproducible (C.V. under 6%) for both QC samples. The overall recovery of the I.S. was estimated to be 80 % (data not shown).

Fig. 2 shows representative chromatograms of blank dog plasma unspiked (A) or spiked (B) with remifentanil and demethoxy-remifentanil. Good resolution of remifentanil from its metabolite and I.S. can be seen. The mean retention times of demethoxy-remifentanil, remifentanil and the I.S. ranged from 3.7 - 4.5, 8.3 - 9.4 and 9.8 - 11 min, respectively. The total time for a chromatographic run, including the time required for re-equilibration, was less than 15 min. Peaks of interest were free of any interfering peak with the exception of the metabolite, where a small peak was constantly observed and was attributed to co-extracted endogenous substances. The actual peak height of demethoxy-remifentanil was determined by introducing a valley-baseline event in the automatic



integrator. This represents a time window within which all valley points are forced as baseline points for peak integration. This technique yielded excellent precision.

The on-column limit of detection was  $0.5 \text{ ng.mL}^{-1}$  and  $0.2 \text{ ng.mL}^{-1}$  for remifentanyl and its metabolite, respectively. The lower limit of quantitation in plasma was  $7.89 \text{ ng.mL}^{-1}$  for remifentanyl and  $15.62 \text{ ng.mL}^{-1}$  for demethoxy-remifentanyl. The corresponding ratios are more than three times the intercept value, which represents the biological matrix value. The sensitivity of our method is comparable to that obtained by Selinger and his co-workers using an HPLC method with UV detection after liquid-liquid extraction [7]. Under the conditions used in their study, the validated analytical ranges for remifentanyl were 10 to 60,135  $\text{ng.mL}^{-1}$ , 1 to 200  $\text{ng.mL}^{-1}$  and 2.5 to 250  $\text{ng.mL}^{-1}$  in dog, human and rat blood, respectively. Obviously, GC chromatography coupled with mass spectrometry [5;6] and LC-MS/MS spectrometry [9] could provide greater sensitivity for both remifentanyl (LLOQ =  $0.1 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) and demethoxy-remifentanyl (LLOQ =  $1 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) determination in human blood. In our opinion, our method could easily be coupled to high resolution mass spectrometry to meet the sensitivity requirements of clinical studies.

The intra-assay precision and accuracy were less than 13% for the four remifentanyl QC concentrations (Table 3) and less than 8 % for the three demethoxy-remifentanyl QCs (Table 3).

The mean parameters for the calibration curves are shown in Table 4. Calibration curves for each analyte were linear over a wide concentration range. However, because of the interfering endogenous peaks, at least one concentration of the demethoxy-remifentanyl was excluded in all calibration curves. Despite this exclusion, the calibration curves still included at least 6 standard concentrations. The mean regression equations for remifentanyl and demethoxy-remifentanyl were  $y = 0.01081x + 0.04400$  ( $r^2 = 0.9957$ ) and  $y = 0.02132x + 0.15770$  ( $r^2 = 0.9955$ ), respectively. Good inter-assay reproducibility was obtained for the slopes (m) of the six calibration curves for both remifentanyl and its metabolite (coefficient of variation less than 8%). However, a higher variability was observed for the intercepts (b).



The suitability of the method for studying the pharmacokinetics of remifentanyl was verified in one anesthetized dog. A plasma sample collected before the injection of an intravenous bolus dose of  $4.4 \text{ mg.kg}^{-1}$  of remifentanyl was found to be free of any interference peaks, except for the usual endogenous peaks eluting before that of demethoxy-remifentanyl (Fig. 2C). A chromatogram obtained from a plasma sample collected 2 min after injection of remifentanyl in the same dog is shown in Figure 2D. The plasma concentration - time profile for this dog reveals that the remifentanyl plasma concentration declined from  $18,300 \text{ ng.mL}^{-1}$  at 2 min to  $13.4 \text{ ng.mL}^{-1}$  at 2 h after injection. For the metabolite, a maximum concentration of  $6,054 \text{ ng.mL}^{-1}$  was reached at 15 min followed by a slower decline (Fig. 3). Most samples required dilution to fall well within the limit of quantification of either the parent drug or metabolite.



### 1.5. Conclusion

In summary, this is the first solid-phase assay that to allow simultaneous extraction of remifentanil and its major metabolite in plasma. Solid-phase extraction offers significant improvement in the speed of execution without sacrificing of ease, precision, sensitivity or selectivity, therefore offering a good alternative to liquid-liquid extraction. A definite advantage of using plasma as the biological matrix instead of blood is that extraction does not have to follow immediately sample collection. Moreover, pharmacokinetic parameters can be readily compared with those obtained for the other opioids.



### 1.6. Reference list

- [1] T.D. Egan, H.J. Lemmens, P. Fiset, D.J. Hermann, K.T. Muir, D.R. Stanski and S.L. Shafer, *Anesthesiology*, 79 (1993) 881.
- [2] J.R. Halliburton, *AANA Journal*, 56 (1988) 229.
- [3] P.S. Glass, D. Hardman, Y. Kamiyama, T.J. Quill, G. Marton, K.H. Donn, C.M. Grosse and D. Hermann, *Anesth Analg*, 77 (1993) 1031.
- [4] J.F. Hoke, F. Cunningham, M.K. James, K.T. Muir and W.E. Hoffman, *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 281 (1997) 226.
- [5] C.M. Grosse, I.M. Davis, R.F. Arrendale, J. Jersey and J. Amin, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 12 (1994) 195.
- [6] D. Lessard, B. Comeau, A. Charlebois, L. Letarte and I.M. Davis, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 12 (1994) 659.
- [7] K. Selinger, C. Lanzo and A. Sekut, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 12 (1994) 243.
- [8] S.H. Haidar, Z. Liang, K. Selinger, L. Hamlett and N.D. Eddington, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 14 (1996) 1727.
- [9] J. Bender, J. van den Elshout, K. Selinger, G. Broeders, J. Dankers and C. van der Heiden, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, 21 (1999) 559.
- [10] T.D. Egan, *Clin.Pharmacokinet.*, 29 (1995) 80.
- [11] J. Manullang and T.D. Egan, *Anesth Analg*, 89 (1999) 529.





### 1.7. Figure legend

Figure 1. The metabolic pathways of remifentanil are illustrated. Remifentanil is metabolized by ester hydrolysis, primarily to GI90291. Structure of GI97559, internal standard in HPLC assay. Reproduced with permission <sup>307</sup>.

Figure 2. Representative chromatograms of dog plasma extracts. (A) Drug-free dog plasma sample, (B) calibration standard 1000 ng.mL<sup>-1</sup>, (C) and (D) dog plasma collected from pentobarbital anesthetized dog before bolus administration (C), and 5 min after the injection of an intravenous bolus of 4.4 mg.kg<sup>-1</sup> of remifentanil chloride (D).

Figure 3. Plasma concentration-time profiles of remifentanil and demethoxy-remifentanil after a bolus dose of 4.4 mg.kg<sup>-1</sup> of remifentanil chloride in an anesthetized dog.

Table 1. Stability of remifentanyl ( $1000 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) added to fresh dog blood containing citric acid ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) and/or echothiophate ( $40 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ )

Lapsed time (min)	Stability on ice			<i>Ex vivo</i> stability*	
	Citric acid	Echothiophate	Citric acid + Echothiophate	Control	Control
0	100	100	100	100	100
30	113 (3)	111 (3)	122 (6)	102 (2)	102 (6)
120	111 (3)	108 (3)	117 (1)	105 (3)	102 (7)
240	112 (4)	102 (2)	118 (2)	96 (4)	94 (5)

The results are presented as mean percent of baseline value with standard deviation in brackets ( $n = 3$ ).

\* Remifentanyl was spiked in a blood aliquot maintained at  $37^{\circ}\text{C}$ . The aliquot was subsequently placed on ice.

Table 2. Recovery of remifentanil and demethoxy-remifentanil from dog plasma

	Remifentanil		Demethoxy-remifentanil	
<b><i>Concentration (ng.mL<sup>-1</sup>)</i></b>	<b><i>40</i></b>	<b><i>1250</i></b>	<b><i>40</i></b>	<b><i>1250</i></b>
Mean percent recovery (%)	106	101	77	80
SD	3.7	7.2	3.9	3.6
CV (%)	3.5	7.1	5.0	4.4
N	4	4	4	4

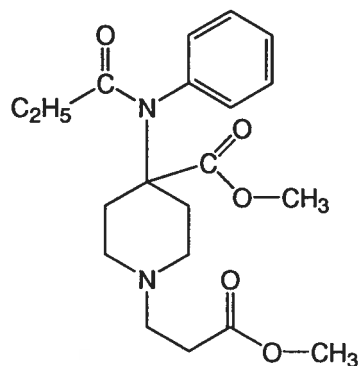
Table 3. Intra-assay and inter-assay precision and accuracy of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl

	Remifentanyl						Demethoxy-remifentanyl							
	Intra-assay			Inter-assay			Intra-assay			Inter-assay				
Concentration (ng.mL <sup>-1</sup> )	20	40	200	1250	20	40	200	1250	40	200	1250	40	200	1250
Mean	21	44	202	1268	21	43	204	1292	37	203	1315	42	195	1296
SD	1	1.5	3	59	1	2	10	65	2	3	34	3	15	55
CV (%)	2	3	2	5	5	5	5	5	5	1	3	8	8	4
Bias (%)	3	11	1	1	5	9	2	3	-7	1	5	4	-3	4
N	4	4	4	4	11	12	11	11	4	4	4	10	12	11

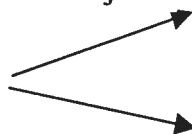
Table 4. Remifentanil and demethoxy-remifentanil curve parameters summary

Remifentanil						Demethoxy-remifentanil					
Curve	$r^2$	$m$	$b$	$n$	$r^2$	$m$	$b$	$n$	$r^2$	$m$	$b$
1	0.9978	0.00978	0.05477	9	0.9987	0.02008	0.31209	7			
2	0.9927	0.01155	0.05201	9	0.9955	0.02314	-0.01988	8			
3	0.9975	0.01173	0.03500	9	0.9929	0.02264	-0.25480	7			
4	0.9920	0.01085	0.03012	9	0.9989	0.01929	0.17668	6			
5	0.9964	0.01062	0.01308	9	0.9933	0.02078	0.04975	8			
6	0.9978	0.01030	0.07930	9	0.9939	0.02196	0.68255	8			
<b>Mean</b>	0.9957	0.01081	0.04405		0.9955	0.02132	0.15773				
<b>SD</b>	0.00266	0.00074	0.02305		0.00268	0.00151	0.32032				
<b>CV (%)</b>	0.27	6.87	52.33		0.27	7.09	203.08				

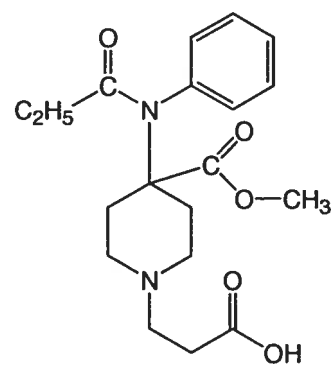
Remifentanyl



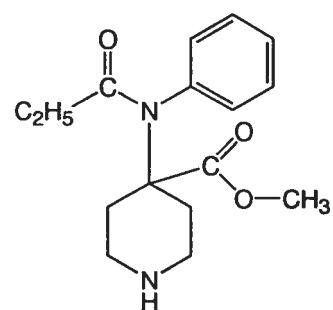
Major



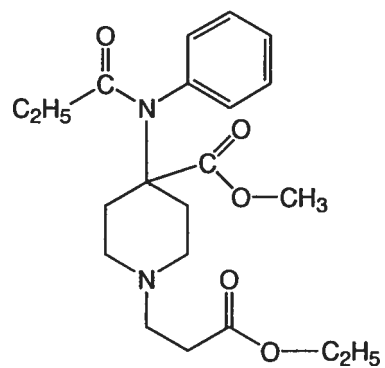
GI90291

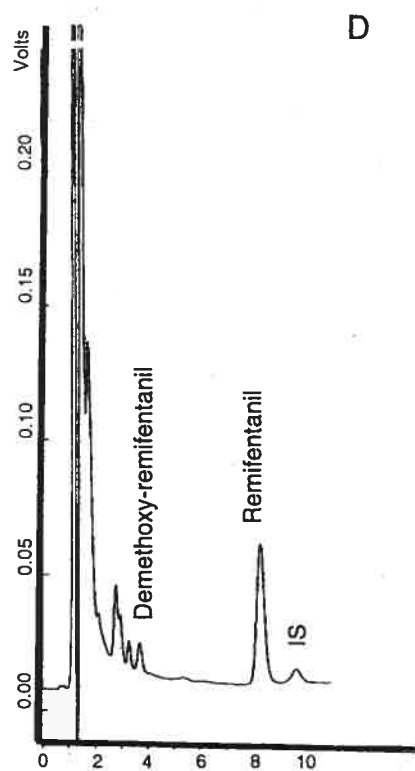
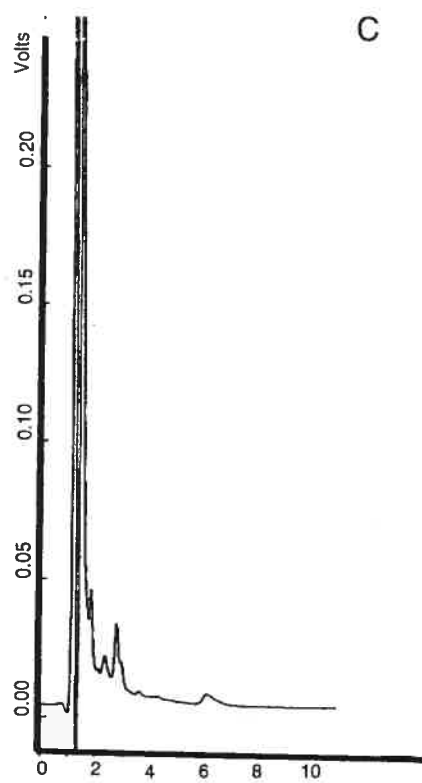
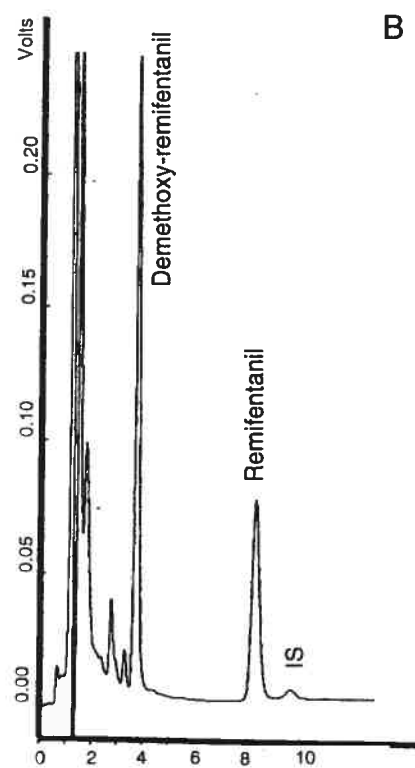
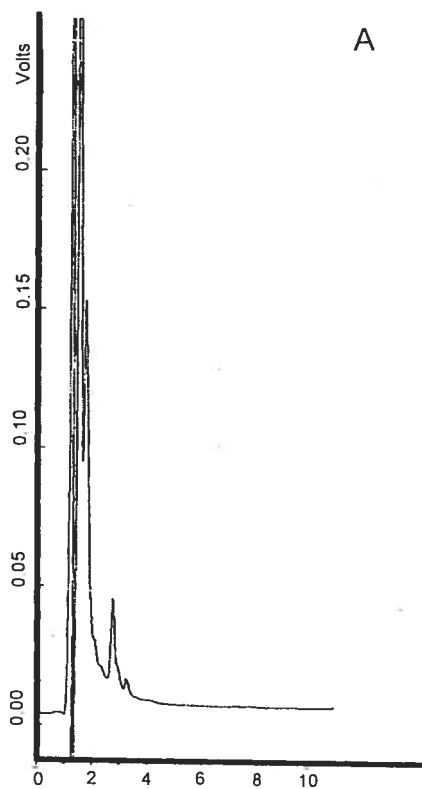


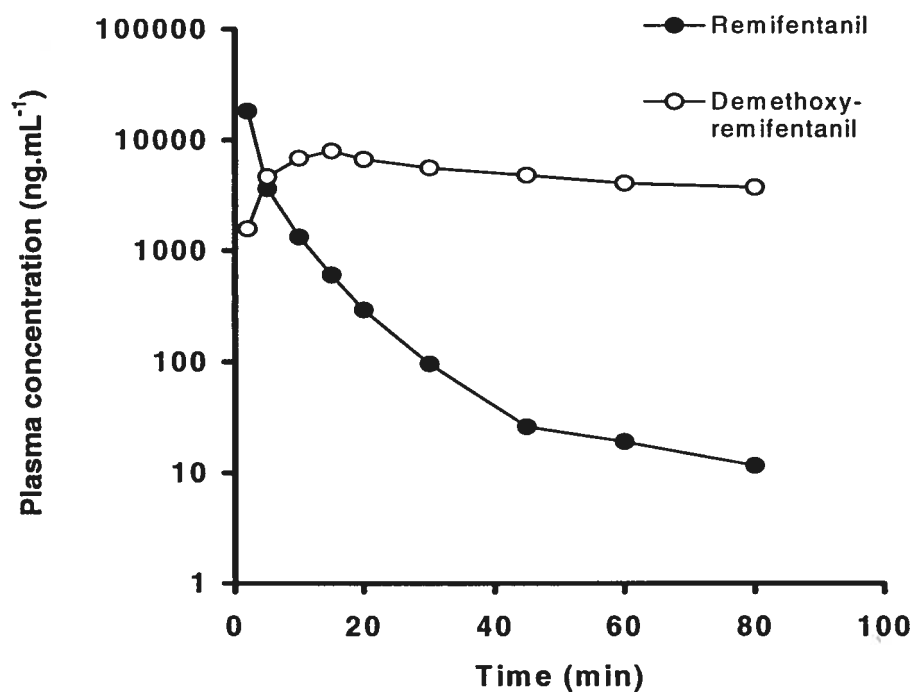
GI94219



GI97559









**2. Impact of peripheral elimination on the concentration-effect relation of remifentanyl in anaesthetized dogs** [*British Journal of anaesthesia*, **94** (3): 357-365 (2005)]

By

Meriam Kabbaj<sup>1</sup>

Pascal Vachon<sup>2</sup>

France Varin<sup>1</sup>

1. Faculté de pharmacie  
Université de Montréal

2. Faculté de médecine vétérinaire  
Université de Montréal

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MA10274). A Canadian Institutes of Health Research-Research and development studentship was awarded to M.K. Remifentanyl was provided by Abbott Laboratories.

**Acknowledgment.** The authors would like to thank Johanne Couture and Sanae Yamaguchi for their technical support.



## 2.1. Abstract

**Summary:** This study elucidates the impact of sampling site when estimating pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) parameters of drugs such as remifentanyl that undergo tissue extraction in the biophase. The interrelations between the concentrations of remifentanyl predicted for the effect compartment and those measured in arterial, venous and cerebrospinal fluid were investigated under steady state conditions.

**Methods:** After induction of anaesthesia with pentobarbital, an arterial cannula (femoral) and two venous catheter (jugular and femoral) were inserted. Electrodes were placed for EEG recording of theta waves activity. Each dog received two consecutive 5 min-infusions for the PK-PD study and a bolus followed by a 60 min-infusion was started for the steady state study. Cerebrospinal fluid, arterial and venous blood samples were drawn simultaneously after 30, 40 and 50 min. At the end of infusion, arterial blood samples were collected for pharmacokinetic analysis.

**Results:** Remifentanyl PK-PD parameters based on theta waves activity were as follows:  $V_{d_{ss}}$  ( $231 \pm 37 \text{ mL kg}^{-1}$ ),  $Cl$  ( $63 \pm 16 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ),  $t_{1/2\beta}$  (7.71 min),  $EC_{50}$  ( $21 \pm 13 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and  $k_{e0}$  ( $0.48 \pm 0.24 \text{ min}$ ). The mean steady state cerebrospinal fluid concentration of  $236 \text{ ng mL}^{-1}$  represented 52 and 74 % of that in arterial and venous blood, respectively.

**Conclusions:** After correction for the plasma unbound fraction ( $71 \pm 8 \%$ ), brain extraction ( $32 \pm 12 \%$ ) and cellular partition coefficient (0.89), the concentrations of remifentanyl predicted for the effect compartment ( $292 \text{ ng mL}^{-1}$ ), when based on arterial sampling, can provide a close approximation of the cerebrospinal fluid concentrations under steady state conditions.

**Keywords:** *Remifentanyl; arterio-venous gradient; cerebrospinal fluid; peripheral elimination*



## 2.2. Introduction

Remifentanil was designed to be short acting by incorporating a methyl ester group susceptible to enzymatic hydrolysis.<sup>1</sup> Unlike other opioids, remifentanil undergoes widespread metabolism by blood and tissue non-specific esterases.<sup>2, 3</sup> Chism and Rickert have previously shown that amongst all tissues examined in dogs, the muscle, intestines and brain exhibited the highest extraction ratios.<sup>4</sup> The pioneer work of Chiou and colleagues emphasized the marked dependence of drug concentration on blood sampling site.<sup>5, 6</sup> In non-steady state pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) studies, the time lag between the maximum concentration in arterial and venous blood has always been a major concern.<sup>7-11</sup> It was stated that the concentration-effect relation could be best described by measuring arterial blood, since it carries the drug to various parts of the body to produce the pharmacological response. However, for drugs undergoing tissue extraction the question remains unclear.

Several investigators pointed out the implications of having an arteriovenous gradient present at the sampling site on the concentration-effect relation of a drug. Parameters such as the  $EC_{50}$ ,  $k_{e0}$  and gamma have been shown to differ for atracurium.<sup>12</sup> This effect would be amplified for a drug such as remifentanil that is rapidly eliminated within the biophase itself. Recently, Hermann and his co-workers pointed out that inappropriate conclusions such as acute tolerance could have been inferred if venous samples were used for the estimation of remifentanil PK-PD parameters in female volunteers.<sup>13</sup>

The primary objective of our study was to elucidate the impact of sampling site when estimating PK-PD parameters of drugs undergoing tissue extraction in the biophase. For doing so, we investigated the interrelation between the predicted effect compartment concentrations of remifentanil, a drug undergoing tissue elimination, and the concentrations measured in arterial, venous and cerebrospinal fluid sampling sites under steady state



conditions. A pharmacokinetic-pharmacodynamic study of remifentanyl in pentobarbital-anaesthetized dogs was thus undertaken.



## 2.3. Materials and methods

### 2.3.1. Chemicals

Remifentanil hydrochloride and the internal standard (I.S.) (GI 97559) were provided by Glaxo-Wellcome (Stevenage, UK). The commercial preparation Ultiva<sup>®</sup> (5 mg-vial) was supplied by Abbott Laboratories (Montréal, Québec, Canada). All solvents were of HPLC grade and purchased from Anachemia (Montréal, Québec, Canada).

### 2.3.2. Animal preparation

Experimental procedures in this study adhered to the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Université de Montréal Animal Care and Ethics Committee prior to animal experimentation. The *in vivo* experiment conducted in anaesthetized dogs is schematized in Figure 1.

#### 2.3.2.1. Animals

Mongrel ( $n = 5$ ) and beagle ( $n = 2$ ) dogs (8.8-20 kg) were obtained from Biolab (Montréal, Québec, Canada). The animals were fasted overnight but allowed free access to water. On the day of the experiment, each dog was anaesthetized with an iv dose of sodium pentobarbital (Somnotol<sup>®</sup>, 30 mg kg<sup>-1</sup>). The level of anaesthesia was monitored and adjusted according to haemodynamic parameters as well as cornean reflex. Intermittent bolus doses (4 mg kg<sup>-1</sup>) were administered for maintenance of deep anaesthesia. Respiration was controlled through an endotracheal tube, with room air delivered by a respirator (model 607, Harvard, South Natick, MA). Body temperature was monitored and kept constant at 38°C throughout the experiment by a thermoregulator (model 74; Yellow Springs Instruments, Yellow Spring OH) connected to a heating pad.

### 2.3.2.2. Implantation of electrodes and recording

Before surgery, four surface electrodes (circular silver / silver chloride, SAFELEAD<sup>®</sup> model) were placed bilaterally on the skin for centro-parietal electroencephalogram (EEG) recording using a four-channel polygraph (Grass Model 7400, Astro-Med, West Warwick, RI). The low pass filter was set at 60 Hz, the time constant at 0.3 s and the gain at 50  $\mu\text{V cm}^{-1}$ . The EEG waveform was allowed to stabilize in each dog and 5-min recording periods were taken at 90, 60 and 30 min before drug administration to verify the adequacy of the signal. Grass Polyview<sup>™</sup> software (version 2.1, Astro-Med, West Warwick, RI) was used for data acquisition and off-line analysis.

### 2.3.2.3. Animal surgery

The right femoral vein was cannulated with polyethylene tube for remifentanil and pentobarbital administration and the right femoral artery was cannulated for blood sampling. A pressure transducer was connected to the arterial line cannula. A three-way stopcock was placed between the dog and the pressure transducer to allow a switch between blood pressure measurement and arterial blood sampling. Electrocardiogram leads were inserted subcutaneously into the right and left hindlimbs and forelimbs. Haemodynamic parameters were monitored using a polygraph system (model RM-6000, Nihon Kohden). An indwelling catheter (Cathelon<sup>®</sup>, Critikon, Tampa, Florida) was inserted in the left external jugular vein to allow venous blood sampling.

### 2.3.2.4. Protein binding

Before starting remifentanil infusion, 8 mL of blood were collected in a tube containing 800  $\mu\text{L}$  of sodium citrate 0.129 M. After centrifugation, blank plasma was kept frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until protein binding determination. Remifentanil was spiked, extemporaneously, in thawed blank plasma of each dog to provide a final concentration of



1000 ng mL<sup>-1</sup>. Ultrafiltration was performed in duplicate using 30,000-μ membranes (Amicon Centrifree Micropartition System, Beverly, MA). Ultrafiltration devices containing 1 mL of plasma were centrifuged at 1900 g for 5 min at room temperature. An aliquot (50 μl) of the ultrafiltrate was then diluted in 450 μl of acidified plasma and processed as plasma samples. Total (C<sub>p</sub>) and unbound concentrations (C<sub>p,u</sub>) were determined the same day by high-pressure liquid chromatography.<sup>14</sup> The free fraction (f<sub>u,p</sub>) was calculated from the ultrafiltrate / total concentration ratio.

### 2.3.3. Pharmacodynamic period

Each dog received two consecutive 5 min-infusions of Ultiva® 1 mg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> and 10 mg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. This infusion scheme was designed to obtain a slow onset of action (infusion #1) and a robust characterization of the terminal elimination half-life (infusion #2). EEG was recorded continuously from drug administration until 40 min after. Blood samples (3 mL) were collected in chilled heparinized tubes at 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12 14 and 20 min after the first infusion started.

### 2.3.4. Washout period

*Cerebrospinal fluid puncture.* Before the steady state infusion started the animal was placed in lateral recumbency with the nose flexed and ears pulled ventrally. A spinal needle was slowly introduced and cerebrospinal fluid was punctured from the cisterna magna, between the occipital crest and the most prominent points of the wings of the atlas. When cerebrospinal fluid started flowing out of the needle, the stylet was replaced until cerebrospinal fluid sampling.



### **2.3.5. Steady state period**

Approximately two hours after the second infusion stopped, each dog received a bolus dose of remifentanyl Ultiva® 50 µg kg<sup>-1</sup>, immediately followed by a 60-min infusion of 40 µg kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (infusion #3).

#### **2.3.5.1. Arterio-venous gradient**

At steady state, arterial (femoral) and venous (jugular) blood samples (3 mL) were simultaneously collected 30, 40 and 50 min after remifentanyl infusion #3 started. Blood samples were collected into heparinized tubes maintained on ice and centrifuged within half an hour. Plasma was stored at -70°C until HPLC analysis. Plasma samples were assayed in duplicate and the mean of the two values was used.

#### **2.3.5.2. Cerebrospinal fluid samples**

At steady state, cerebrospinal fluid (0.7 mL) was collected into acidified tubes (7 µl of citric acid 50%) at times corresponding to blood sampling. A volume of cerebrospinal fluid equivalent to the calculated dead volume of the needle was discarded before each sample collection. Cerebrospinal fluid samples were frozen at -70°C until HPLC analysis.

### **2.3.6. Pharmacokinetic period**

At the end of remifentanyl infusion, arterial blood samples (3 mL) were collected 1 min before the infusion ended, then every 2 min for 15 min and finally every 5 min for 15 additional minutes.

At the end of the experiment, dogs were sacrificed using a mixture of KCl and pentobarbital.



### 2.3.7. Red blood cell / plasma partition coefficient

Distribution in red blood cell (RBC) was investigated ex vivo in a separate set of dogs as described previously.<sup>15</sup> Remifentanyl (1000 ng mL<sup>-1</sup>) was incubated in blood at 37°C under gentle agitation (horizontal Eberbach). Samples (6 mL) were collected at 5, 60, 90 and 120 min. An aliquot (4 mL) was centrifuged. Remifentanyl concentrations in whole blood (Cb) and plasma (Cp) were determined in triplicate by HPLC after liquid-liquid extraction.<sup>16</sup> Using the haematocrit value (Hct), it was possible to calculate red blood cell / plasma partition coefficient as follows:

$$\frac{CRBC}{C_p} = \frac{C_b/C_p - (1 - Hct)}{Hct} \quad (1)$$

### 2.3.8. Sample analysis

A selective and specific high performance liquid chromatographic method previously developed for the quantitation of remifentanyl in dog plasma was used.<sup>14</sup> Briefly, plasma and cerebrospinal fluid samples (0.5 mL) were extracted on C-phenyl solid phase cartridges (Phenomenex, Torrance, CA).

Separation was performed on a 5 µm reversed-phase Spherisorb C<sub>1</sub> column (150 x 4.6 mm I.D.) purchased from Phenomenex (Torrance, CA). The mobile phase contained 28% of organic solvent in 2.4 mM potassium phosphate buffer and was delivered at a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. UV detection was set at 210. Peak integration was performed using Star Chromatography Varian Software version 4.51 (Walnut Creek, CA).

This method allowed quantitation of remifentanyl levels as low as 7.81 ng mL<sup>-1</sup>. The coefficients of variation for intra- and inter-day precision were less than 11 % over the concentration range of 7.81 - 2000 ng mL<sup>-1</sup>.



### 2.3.9. Data analysis

#### 2.3.9.1. Pharmacodynamic analysis

The EEG signal was digitized in the analog-to-digital converter and processed by the computer. A quantitative analysis of 30 sec-epochs was made continuously from 5 min before drug injection until the EEG waveform returned to baseline. A fast Fourier function transformation was used to calculate the power spectrum of the selected epoch (30,000 sample points) to obtain power spectral density versus frequency histograms (amplitude<sup>2</sup> Hz<sup>-1</sup>). The power spectral density was computed for the following 4 predefined frequency bands: 0-4 Hz (delta waves), 4-8 Hz (theta waves), 8-12 Hz (alpha waves) and 12-30 Hz (beta waves). For each epoch the absolute power in theta band was selected for the analysis of remifentanyl pharmacodynamics. In the first two dogs, the signal was too noisy (interferences caused by the surgical lights and the heating pad) and the median value for six epochs over a 3-min period was used instead. Variability in the baseline signal ranged between 10 and 16% and theta activity did not change significantly upon administration of pentobarbital bolus.

#### 2.3.9.2. Pharmacokinetic analysis

The pharmacokinetics of remifentanyl was evaluated for individual dogs using a traditional two-compartment model with two consecutive zero order input rates followed two hours later by an iv bolus and a zero order input rate, with elimination from central compartment. Goodness of fit was evaluated according to the Akaike's information criterion.<sup>17</sup> Pharmacokinetic analysis was based on iterative linear least square regression analysis using WinNonlin software (WinNonlin, Professionnal Edition version 1.5, Pharsight, Mountain View, Ca). A weighting function  $1/(\text{predictedY})$  was applied. Descriptive curve parameters were determined: the distribution ( $\alpha$ ) and elimination ( $\beta$ ) rate constants and their corresponding A and B coefficients. The following parameters were

derived: the first-order rate constant of elimination from the central compartment ( $k_{10}$ ), the first-order rate constants associated with drug transfer from compartment 1 to compartment 2 ( $k_{12}$ ) and from compartment 2 to compartment 1 ( $k_{21}$ ). The volume of the central compartment ( $V_1$ ), the steady state volume of distribution ( $V_{d_{ss}}$ ) and the total clearance (Cl) were then calculated.

### 2.3.9.3. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling

For each dog, the pharmacokinetic parameters derived for remifentanil were fixed during the two-step pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling. A parametric link model was used to derive the elimination rate constant from the hypothetical effect compartment ( $k_{e0}$ ) using WinNonlin software. The sigmoid  $E_{max}$  model was used to determine the remifentanil concentration that produces 50% of the maximal observed effect ( $EC_{50}$ ) and the slope factor  $\gamma$ . The baseline value  $E_0$  was measured before remifentanil administration and was fixed as an initial parameter for the model:

$$E = \frac{E_{max} C^{\gamma}}{EC_{50}^{\gamma} + C^{\gamma}} + E_0 \quad (2)$$

A weighting function of 1 was applied. Goodness of fit was assessed by the Akaike information criterion.<sup>17</sup>

### 2.3.9.4. Arterio-venous gradient

For each dog, the arterial concentrations ( $C_{p_{ss,a}}$ ) measured at the three collection times were compared using the Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks. After statistical confirmation of steady state conditions, the three concentrations were averaged. Venous concentrations ( $C_{p_{ss,v}}$ ) were treated similarly and remifentanil arterio-venous gradient ( $E_{brain}$ ) across the brain was calculated as follows:



$$E_{\text{brain}} (\%) = \frac{C_{p_{ss, a}} - C_{p_{ss, v}}}{C_{p_{ss, a}}} \times 100 \quad (3)$$

### 2.3.9.5. Effect compartment concentration

For each dog, the pharmacokinetic and pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters derived were then used to predict the pharmacological concentration in the effect compartment ( $C_e$ ). In a two-compartment model, drug concentration in the effect compartment after iv infusion can be expressed as follows.<sup>18</sup>

$$C_e = \frac{k_{e0}k_0}{V_c} \left[ \frac{(E_2 - \alpha)}{\alpha(\beta - \alpha)(k_{e0} - \alpha)} (1 - e^{-\alpha T}) e^{-\alpha t'} + \frac{(E_2 - \beta)}{\beta(\alpha - \beta)(k_{e0} - \beta)} (1 - e^{-\beta T}) e^{-\beta t'} + \frac{(E_2 - k_{e0})}{k_{e0}(\alpha - k_{e0})(\beta - k_{e0})} (1 - e^{-k_{e0} T}) e^{-k_{e0} t'} \right] \quad (4)$$

Where  $k_0$  is the infusion rate,  $E_2$ , the sum of the rate constants exiting the peripheral compartment (i.e.,  $k_{21} + k_{20}$ ),  $T$ , the time duration of each infusion, and  $t'$ , the time after infusion stops.

The effect compartment concentrations derived were then corrected ( $C_{e, \text{corr.}}$ ) for the plasma unbound fraction, brain extraction and cellular partition coefficient (approximated by red blood cell / plasma partition coefficient) as follows:

$$C_{e, \text{corr.}} = C_e \times f_u \times (1 - E_{\text{brain}}) \times C_{\text{RBC}} / C_p \quad (5)$$

## 2.4. Results

Arterial blood pressure and heart rate were monitored continuously during remifentanyl administration. Haemodynamic parameters returned to their baseline value 15 to 30 min after infusion #2 ended. Baseline and steady state values (infusion #3) are reported in Table 1. Remifentanyl induced a rapid decrease in heart rate (from 110 to 70 bpm) and a proportional reduction in arterial blood pressure (e.g. from 197/154 to 140/93 mm Hg). Haematocrit was stable throughout the experiment.

Remifentanyl did not produce typical  $\mu$ -opioid effects on the EEG of pentobarbital-anaesthetized dogs. The activity in the delta band did not change when remifentanyl concentrations increased (data not shown). The absolute power in the different frequency bands  $>4$  Hz increased, but only the changes in the theta band correlated closely with drug concentration.

Raw data for the EEG effect of remifentanyl and the plasma concentration of remifentanyl in function of time are presented in Figure 2. Owing to a different level of anaesthesia before remifentanyl administration, the raw baseline EEG signal varied between dogs. This is consistent with the high coefficient of variation observed for  $E_0$  (Table 2). Accordingly, for graphical illustration purposes, the data represented in Figure 2A are displayed as a percentage of maximal observed effect. The profiles showed a rapid onset and termination of effect. The mean estimate of  $\gamma$  representing the sigmoidal relationship between effect site concentrations and EEG changes was  $1.79 \pm 0.51$  (Table 2). The mean equilibration half-life between remifentanyl effect and central compartment concentrations ( $t_{1/2} k_{e0}$ ) was 1.44 min (Table 2). Using the absolute power between 4-8 Hz, the mean  $EC_{50}$  value of remifentanyl in the presence of pentobarbital was found to be  $21 \text{ ng mL}^{-1}$  (Table 2, Fig. 3).

The plasma concentration-time profile of remifentanyl, was adequately described by a two compartment pharmacokinetic model (Fig. 4). The pharmacokinetic parameter estimates for remifentanyl in anaesthetized dogs (mean  $\pm$  SD) are listed in Table 3. The mean terminal elimination half-life of remifentanyl in dogs was estimated to be 7.71 min.

The mean remifentanyl red blood cell / plasma partition coefficient obtained by ex vivo incubation was  $0.89 \pm 0.01$ . The mean unbound plasma fraction of remifentanyl was 71% (Table 4).

Based on statistical analysis, unbound arterial plasma concentrations ( $C_{p_{ssu,a}}$ ) were stable in each dog during the three sampling periods ( $P = 0.564$ ) confirming that steady state was reached. Unbound venous concentrations ( $C_{p_{ssu,v}}$ ) were found to be consistently lower than unbound arterial concentrations (Table 4). Mean jugular venous concentration amounted to 70 % of mean arterial concentration ( $P = 0.005$ ). The mean of individual arterio-venous gradient across the brain averaged 34 % (Table 4).

During steady state, the mean concentration of remifentanyl in the cerebrospinal fluid was  $236 \text{ ng mL}^{-1}$  and represented 77 % and 54 % of the unbound concentrations in the jugular vein and femoral artery, respectively (Table 4). The mean predicted effect compartment concentration at steady state was  $641 \text{ ng mL}^{-1}$  and approximated total arterial concentrations. When a correction factor was applied to  $C_{e_{ss}}$  accounting for brain extraction, unbound fraction and cellular partition coefficient, the resulting mean concentration ( $C_{e_{ss,corr}}$ ) of  $292 \text{ ng mL}^{-1}$  (Table 4) was close to that measured in the cerebrospinal fluid under steady state conditions ( $236 \text{ ng mL}^{-1}$ ). The simulations indicated that, when infusion is stopped the  $C_{e,corr}$  are similar or slightly exceed arterial concentrations (Fig. 4).

## 2.5. Discussion

Under-steady state conditions, a large gradient between the arterial and cerebrospinal fluid concentrations of remifentanyl was observed in anaesthetized dogs. This gradient was less pronounced with the venous concentrations. When a correction factor taking into account plasma protein binding, tissue extraction and cell partition coefficient was applied to the arterial concentrations, the effect compartment concentrations derived by PK-PD modeling were representative of those measured in the biophase.

Like other opioids, remifentanyl produces a dose-dependent suppression of the electroencephalogram with an overall decrease in frequency and increase in amplitude. The power in the low frequency bands (0.5-9.5 Hz) increases but the increase in the delta-band (0-4 Hz) is generally greater than that in the theta-band (4-8 Hz).<sup>19</sup> This may explain why delta activity in anaesthetized rats and dogs<sup>20, 21</sup> and spectral edge in conscious rats<sup>22</sup> and humans<sup>13, 23, 24</sup> have been the most widely used parameters to quantitate the changes induced on the EEG raw signal during remifentanyl PK-PD studies. In our study, dogs were maintained under pentobarbital anaesthesia before the administration of remifentanyl; consequently, 95% of the total power spectrum was located in the delta band at baseline. This explains why spectral edge was not chosen to measure remifentanyl-induced EEG changes.

When the absolute power in each frequency band was computed over time, we observed that delta activity remained stable after remifentanyl administration while that in the theta band changed according to remifentanyl blood concentrations. Using the absolute theta power instead of the relative theta ratio for the monitoring of remifentanyl effect in pentobarbital-anaesthetized animals yielded the best correlation with the traditional sigmoid  $E_{\max}$  model. This may be explained by the interdependence of the different frequency bands that results from both the calculation of the relative power itself<sup>25</sup> and the low contribution of the theta band in the total power spectrum.

Remifentanyl showed a rapid onset and a short duration of action in our dogs, a finding similar to that reported in isoflurane-anaesthetized dogs.<sup>20</sup> Based on changes in the



theta band, the mean equilibration rate half-life between remifentanyl plasma and effect compartment concentrations ( $t_{1/2} k_{e0}$ ) represented 1.4 min (Table 2). Similar values were obtained using spectral edge in conscious patients (0.8 and 1.6 min)<sup>13, 23, 24</sup> and in rats pretreated with midazolam (1.77 and 2.19 min).<sup>22</sup> In isoflurane-anaesthetized dogs, the  $t_{1/2} k_{e0}$  estimated by spectral edge was much longer than that estimated with delta activity,<sup>20</sup> suggesting that the former is probably not the best surrogate marker for remifentanyl activity in anaesthetized animals.

In our dogs, the mean  $EC_{50}$  of remifentanyl was found to be 21 ng mL<sup>-1</sup>. (Table 2). Fourfold lower values were observed for the two beagles (#6 and #7), which might be attributed to a higher sensitivity to opioids in that race. These values are very similar to those obtained earlier using spectral edge in conscious rats (26-32 ng mL<sup>-1</sup>)<sup>22</sup> or conscious volunteers (11–20 ng mL<sup>-1</sup>)<sup>13, 23, 24</sup> but differ from those determined in isoflurane-anaesthetized dogs using either spectral edge or relative delta activity (0.97 and 0.64 ng mL<sup>-1</sup>, respectively).<sup>20</sup> As the potency of remifentanyl was based on the theta band activity in our study, comparison with other studies is difficult.

There are many reasons why arterial sampling is deemed preferable to venous sampling in PK-PD studies, the major one being that arterial levels are more representative of the concentration delivered to the effect site during the onset period.<sup>26</sup> It is unclear whether this is valid for drugs undergoing elimination in the biophase. Hermann and colleagues<sup>13</sup> found a clockwise hysteresis between EEG activity and remifentanyl venous blood concentration while a counterclockwise hysteresis was observed with arterial data. Such finding was not interpreted as the development of acute tolerance, but as a faster equilibrium between the effect site and arterial concentrations compared to that between arterial and venous levels. However, drug elimination in the biophase may also contribute to this effect.

Sampling site is also crucial for determining the “true” clearance of a drug. From a pharmacokinetic point of view, dosing and sampling should take place from the same site to avoid any bias. Since intra-arterial drug administration is not acceptable, this complicates the interpretation of PK parameters obtained from arterial concentrations after IV drug



administration of a drug undergoing peripheral elimination. Notwithstanding this, the systemic clearance in our dogs is similar to that measured previously in seven isoflurane-anaesthetized dogs ( $63 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ).<sup>20</sup>

In our study, steady state arterial concentrations of remifentanyl were 1.4 times higher than those in the jugular vein. This brain extraction ratio of 34% is higher but consistent with that observed in two pentobarbital-anaesthetized dogs (24%) (Table 4)<sup>4</sup>. Similarly, after the administration of a bolus dose of remifentanyl to healthy female subjects, a 40 % overestimation in the systemic clearance was observed when calculations were based on data obtained from a peripheral vein.<sup>13</sup> Of interest, the systemic clearance of remifentanyl in pentobarbital/barbital anaesthetized dogs<sup>4</sup> was reported to be 3-4 times higher ( $133 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) than that observed in conscious dogs ( $41 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ).<sup>4</sup> It was suggested that the higher clearance was due to a higher arteriovenous gradient in the femoral vein compared to the saphenous. This indicates that the site of placement of the venous catheter (or regional tissue uptake) will also have a major impact on the estimation of the systemic clearance for a drug exhibiting peripheral elimination.

Compared to alfentanil, remifentanyl is more hydrophilic (octanol / water partition coefficient of 18 and 129, respectively) and the non-ionized fraction in plasma is lower (67 vs 89%) which could in part explain a smaller  $V_{d_{ss}}$  for remifentanyl. Nevertheless, this value remains too small to account for the intracellular distribution of remifentanyl. Thus, a compartmental model accounting for both central and peripheral elimination could have been applied to estimate remifentanyl  $V_{d_{ss}}$ , an exit-site dependent parameter but this would have no impact on the estimation of the  $k_{eo}$  and  $EC_{50}$  values.<sup>27</sup> For this reason, a pharmacokinetic analysis assuming elimination from the central compartment only was used in this study.

Previous estimates of pharmacokinetic parameters of remifentanyl based on whole blood samples<sup>4, 20</sup> were similar to those derived herein using plasma concentrations. This

implies that remifentanyl red blood cell/plasma partition coefficient should be close to one. Accordingly, remifentanyl mean red blood cell/plasma partition coefficient was shown to be 0.9.

With this approach, the unbound concentration of drug measured in plasma and that predicted for the effect compartment concentrations are assumed equal at distribution equilibrium. This premise allows the derivation of  $C_{e_{ss}}$  without having to know the volume of the effect site compartment. Remifentanyl plasma concentration was corrected for the unbound fraction (0.7) and the concentration in the CSF considered as 100 % unbound in view of the low concentration in proteins. As remifentanyl undergoes elimination in the biophase, the arterio-venous gradient across the brain tissue was also included in the correction factor. Finally, because of the tight junctions present between the endothelial cells in the brain and between the epithelial cells in the choroids plexus we took into account the cellular partition coefficient in the correction factor.

The concentration of remifentanyl was measured in the CSF to verify if the concentration derived for the effect compartment is anatomically and/or physiologically sound. In view of the limitations of the compartmental pharmacokinetic analysis, this type of comparison is often perceived as incorrect. However, attempts have been made in the past years to render the interpretation of compartmental analysis more physiological.<sup>28</sup> By monitoring the EEG, we evaluated the supraspinal action of the opioid that causes sedation and not the analgesic action. It would have been impossible to carry out brain microdialysis and EEG monitoring simultaneously without introducing a bias. Although the brain extracellular fluid and the CSF are produced independently, they are in direct communication with one another so that changes in the composition of one are reflected in the composition of the other. In addition, the partition coefficient of remifentanyl is 17 times that of morphine, we assumed that the rate of drug transfer across the blood brain barrier and blood CSF barrier via the choroid plexus would not be rate-limiting.

In our opinion, the CSF is part of the effect compartment but not necessarily the sole component. Our results indicate that the concentration of remifentanil measured in the CSF and that predicted for the effect compartment (after appropriate correction) are very similar under steady state conditions. Therefore, it would be logical to infer that this concentration is representative of the extracellular concentration of remifentanil in the biophase. For remifentanil, a correction factor should therefore be applied to the  $EC_{50}$  based on arterial levels. By doing so, comparison of its potency with other opioids would be more appropriate.



## 2.6. Conclusion

Our study reemphasizes the importance of sampling site when performing pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for an accurate estimation of total clearance and potency of drugs undergoing elimination from the effect compartment. For a drug undergoing tissue elimination such as remifentanil, venous rather than arterial concentrations will reflect more exactly the effect compartment concentrations, under steady state conditions.

However, effect compartment concentrations are ideally derived from arterial data in pharmacokinetic-pharmacodynamic studies. After correction for the plasma unbound fraction, ( $71 \pm 8 \%$ ), brain extraction ( $34 \pm 11\%$ ) and cellular partition coefficient (0.89), the concentrations of remifentanil predicted for the effect compartment ( $292 \text{ ng mL}^{-1}$ ), when based on arterial sampling, can provide a close approximation of the cerebrospinal fluid concentrations ( $236 \text{ ng mL}^{-1}$ ) under steady state conditions. Thus, for drugs eliminated during their passage through the biophase, such a correction is recommended for a good approximation of the effect compartment concentrations.



## 2.7. Reference List

- 1 Feldman PL, James MK, Brackeen MF, Bilotta JM, Schuster SV, Lahey AP, Lutz MW, Johnson MR, Leighton HJ. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of ultrashort- to long-acting opioid analgetics. *J Med Chem* 1991; 34: 2202-8
- 2 Dershwitz M, Hoke JF, Rosow CE, Michalowski P, Connors PM, Muir KT, Dienstag JL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in volunteer subjects with severe liver disease. *Anesthesiology* 1996; 84: 812-20
- 3 Westmoreland CL, Hoke JF, Sebel PS, Hug CC, Jr., Muir KT. Pharmacokinetics of remifentanyl (GI87084B) and its major metabolite (GI90291) in patients undergoing elective inpatient surgery. *Anesthesiology* 1993; 79: 893-903
- 4 Chism JP, Rickert DE. The pharmacokinetics and extra-hepatic clearance of remifentanyl, a short acting opioid agonist, in male beagle dogs during constant rate infusions. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 34-40
- 5 Chiou WL. The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part I). *Clin Pharmacokinet* 1989; 17: 175-99
- 6 Chiou WL. The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part II). *Clin Pharmacokinet* 1989; 17: 275-90
- 7 Fuseau E, Sheiner LB. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics with a nonparametric pharmacodynamic model. *Clin Pharmacol Ther* 1984; 35: 733-41
- 8 Segre G. Kinetics of interaction between drugs and biological systems. *Farmaco [Sci]* 1968; 23: 907-18



- 9 Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 1979; 25: 358-71
- 10 Veng-Pedersen P, Gillespie WR. Single pass mean residence time in peripheral tissues: a distribution parameter intrinsic to the tissue affinity of a drug. *J Pharm Sci* 1986; 75: 1119-26
- 11 Verotta D, Beal SL, Sheiner LB. Semiparametric approach to pharmacokinetic-pharmacodynamic data. *Am J Physiol* 1989; 256: R1005-10
- 12 Donati F, Varin F, Ducharme J, Gill SS, Theoret Y, Bevan DR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of atracurium obtained with arterial and venous blood samples. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 515-22
- 13 Hermann DJ, Egan TD, Muir KT. Influence of arteriovenous sampling on remifentanyl pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 511-8
- 14 Kabbaj M, Varin F. Simultaneous solid-phase extraction with liquid chromatography with ultraviolet absorbance for the determination of remifentanyl and its metabolite in dog plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2003; 783: 103-9
- 15 Holmberg L, Odar-Cederlof I, Nilsson JL, Ehrnebo M, Boreus LO. Pethidine binding to blood cells and plasma proteins in old and young subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1982; 23: 457-61
- 16 Grosse CM, Davis IM, Arrendale RF, Jersey J, Amin J. Determination of remifentanyl in human blood by liquid-liquid extraction and capillary GC-HRMS-SIM using a deuterated internal standard. *J Pharm Biomed Anal* 1994; 12: 195-203
- 17 Holford NH, Sheiner LB. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 1981; 6: 429-53
- 18 Colburn WA. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; 9: 367-88

- 19 Wauquier A, Van den Broeck WAE, Niemgeers CJE, Janssen PAJ. Effects of morphine, fentanyl, sufentanil, and the short-acting morphine-like analgesic alfentanil on the EEG in dogs. *Drug Dev Res* 1981; 1: 167-79
- 20 Hoke JF, Cunningham F, James MK, Muir KT, Hoffman WE. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil, its principle metabolite (GR90291) and alfentanil in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 226-32
- 21 Cox EH, Langemeijer MW, Gubbens-Stibbe JM, Muir KT, Danhof M. The comparative pharmacodynamics of remifentanil and its metabolite, GR90291, in a rat electroencephalographic model. *Anesthesiology* 1999; 90: 535-44
- 22 Haidar SH, Moreton JE, Liang Z, Hoke JF, Muir KT, Eddington ND. The pharmacokinetics and electroencephalogram response of remifentanil alone and in combination with esmolol in the rat. *Pharm Res* 1997; 14: 1817-23
- 23 Egan TD, Minto CF, Hermann DJ, Barr J, Muir KT, Shafer SL. Remifentanil versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology* 1996; 84: 821-33
- 24 Minto CF, Schnider TW, Egan TD, Youngs E, Lemmens HJ, Gambus PL, Billard V, Hoke JF, Moore KH, Hermann DJ, Muir KT, Mandema JW, Shafer SL. Influence of age and gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil. I. Model development. *Anesthesiology* 1997; 86: 10-23
- 25 Mandema JW, Danhof M. Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinet* 1992; 23: 191-215
- 26 Viby-Mogensen J, Ostergaard D, Donati F, Fisher D, Hunter J, Kampmann JP, Kopman A, Proost JH, Rasmussen SN, Skovgaard LT, Varin F, Wright PM. Pharmacokinetic studies of neuromuscular blocking agents: good clinical research practice (GCRP). *Acta Anaesthesiol Scand* 2000; 44: 1169-90
- 27 Laurin J, Donati F, Nekka F, Varin F. Peripheral link model as an alternative for pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of drugs having a very short elimination half-life. *J Pharmacokinet Biopharm* 2001; 28: 7-25



- 28 Mather LE. Anatomical-physiological approaches in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacokinet 2001; 40: 707-22





## 2.8. Figure legend

Figure 1. *In vivo* experimental protocol in pentobarbital anaesthetized dogs receiving different regimens of remifentanyl.

Figure 2. Raw data representing (A) the percentage of the maximal observed absolute power calculated in the theta band (%  $E_{\max}$ ) and (B) the plasma concentration time profile of remifentanyl in pentobarbital anaesthetized dogs.

Figure 3. Observed ( $\circ$ ) and predicted (—) absolute power in the theta band during two consecutive 5-min infusion of remifentanyl in pentobarbital anaesthetized dog #4.

Figure 4. Plasma concentration-time profile of remifentanyl in a pentobarbital anaesthetized dog (#4). Markers represent the unbound arterial ( $\bullet$ ), venous ( $\circ$ ) and cerebrospinal fluid ( $\blacksquare$ ) concentrations. Lines represent the predicted unbound arterial (—) concentrations and effect compartment (---) concentrations corrected for the unbound fraction, brain extraction and tissue partition coefficient.

Table 1. Physiological parameters at baseline and during remifentanyl steady state conditions in pentobarbital anaesthetized dogs

Dogs	Weight (kg)	Hematocrit (%)		Arterial pressure (mm Hg)		Heart rate (bpm)	
		Baseline	Steady-state	Baseline	Steady-state	Baseline	Steady-state
1	11.0	30	31	190 / 170	120 / 100	152	75
2	20.0	40	37	210 / 170	140 / 90	124	65
3	19.8	41	41	180 / 140	130 / 70	110	70
4	17.6	36	36	200 / 180	140 / 110	100	61
5	13.6	35	36	250 / 160	160 / 100	110	70
6	12.2	40	39	180 / 140	150 / 100	86	69
7	8.8	38	35	170 / 120	140 / 80	90	80
<b>Mean</b>	<b>14.7</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>197 / 154</b>	<b>140 / 93</b>	<b>110</b>	<b>70</b>
<b>S.D.</b>	<b>4.4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>27 / 21</b>	<b>13 / 14</b>	<b>22</b>	<b>6</b>

Table 2. Remifentanyl pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters in pentobarbital anaesthetized dogs

Dog	$E_0$ ( $V^2 \text{ Hz}^{-1}$ )		$E_{\max}$ ( $V^2 \text{ Hz}^{-1}$ )		$k_{e0}$ $\text{min}^{-1}$	$EC_{50}$ $\text{ng mL}^{-1}$	$\gamma$	AIC
	Observed	Estimated	Observed	Estimated				
1	0.073	0.065	0.140	0.170	0.44	29	1.71	-305
2	0.004	0.004	0.010	0.012	0.15	24	2.67	-607
3	0.008	0.007	0.014	0.015	0.23	32	1.12	-751
4	0.011	0.010	0.035	0.038	0.75	38	1.43	-626
5	0.013	0.014	0.039	0.037	0.80	12	2.15	-277
6	0.039	0.030	0.070	0.063	0.50	5	1.85	-332
7	0.038	0.029	0.100	0.083	0.52	6	1.58	-398
<b>Mean</b>	<b>0.027</b>	<b>0.023</b>	<b>0.058</b>	<b>0.060</b>	<b>0.48</b>	<b>21</b>	<b>1.79</b>	
S.D.	0.025	0.021	0.048	0.055	0.24	13	0.51	
C.V.	94	94	82	92	50	63	28	

$K_{e0}$ , effect compartment equilibration rate constant;  $EC_{50}$ , effect compartment concentration at 50 % of maximal observed effect;  $\gamma$ , slope factor

Table 3. Remifentanyl pharmacokinetic parameters in pentobarbital anaesthetized dogs

Dog	Descriptive curve parameters				AIC	Microconstants			PK parameters		
	A ng ml <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	B ng ml <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	α min <sup>-1</sup>	β min <sup>-1</sup>		k <sub>10</sub> min <sup>-1</sup>	k <sub>12</sub> min <sup>-1</sup>	k <sub>21</sub> min <sup>-1</sup>	V <sub>1</sub> ml kg <sup>-1</sup>	Cl ml min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	V <sub>ss</sub> ml kg <sup>-1</sup>
1	12.80	0.28	0.449	0.087	58	0.395	0.042	0.099	180	71	256
2	15.88	0.88	0.413	0.092	101	0.349	0.047	0.109	131	46	187
3	35.48	0.93	0.296	0.061	131	0.269	0.021	0.067	133	36	175
4	38.07	3.11	0.865	0.129	83	0.605	0.204	0.185	117	71	245
5	29.52	1.97	0.532	0.115	110	0.434	0.072	0.141	159	69	239
6	37.57	1.76	0.801	0.118	111	0.636	0.133	0.148	120	77	228
7	26.46	0.79	0.551	0.077	88	0.467	0.069	0.091	152	71	269
Mean	27.97	1.39	0.558	0.097		0.451	0.084	0.120	142	63	228
S.D.	10.26	0.96	0.206	0.025		0.132	0.064	0.040	23	16	35
C.V.	37	69	37	25		29	76	33	16	25	15

A,  $\alpha$ , coefficient and initial distribution rate constant; B,  $\beta$ , coefficient and terminal elimination rate constant; k<sub>10</sub>, elimination rate constant from compartment 1; k<sub>12</sub>, transfer rate constant from the first to the second compartment; k<sub>21</sub>, transfer rate constant from the second to the first compartment; V<sub>1</sub>, apparent volume of distribution in the central compartment; Cl, total body clearance; V<sub>ss</sub>, apparent volume of distribution at steady state.

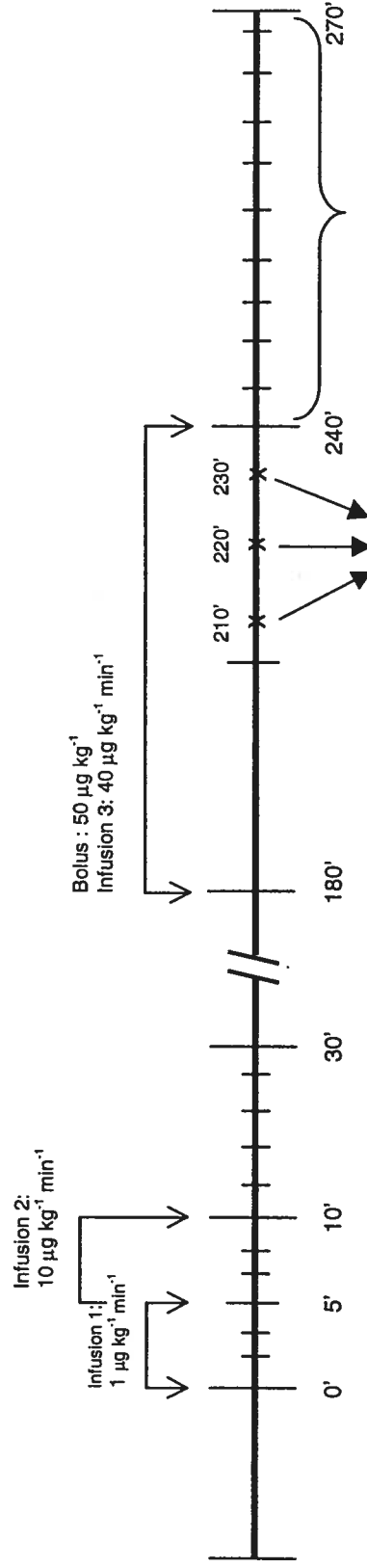
Table 4. Comparison of arterial, venous, cerebrospinal fluid concentrations of remifentanyl with those derived for the effect compartment under steady state conditions in anaesthetized dogs

Dog	$f_{u,p}$ %	$E_{\text{brain}}$ %	$C_{p_{ssu,a}}$ $\text{ng ml}^{-1}$	$C_{p_{ssu,v}}$ $\text{ng ml}^{-1}$	$C_{\text{CSF}}$ $\text{ng ml}^{-1}$	$C_{e_{ss}}$ $\text{ng ml}^{-1}$	$C_{e_{ss,corr.}}$ $\text{ng ml}^{-1}$
1	65	ND	358	ND	185	434	ND
2	61	36	508	324	309	853	296
3	70	22	701	547	313	1082	526
4	69	52	386	184	182	561	165
5	68	37	375	236	215	603	229
6	83	27	378	273	209	521	281
7	81	28	383	279	ND	435	254
<b>Mean</b>	<b>71</b>	<b>34</b>	<b>441</b>	<b>307</b>	<b>236</b>	<b>641</b>	<b>292</b>
S.D.	8	11	125	126	60	240	124
C.V.	11	32	28	41	25	37	42

ND-Not determined

$F_{u,p}$ , free fraction in plasma;  $E_{\text{brain}}$ , brain extraction;  $C_{p_{ssu,a}}$ , steady state unbound arterial concentrations;  $C_{p_{ssu,v}}$ , steady state unbound venous concentrations;  $C_{\text{CSF}}$ , steady state cerebrospinal fluid concentrations;  $C_{e_{ss}}$ , steady state effect compartment concentrations;  $C_{e_{ss,corr.}}$ , steady state effect compartment concentrations corrected for plasma protein binding, brain extraction and cell partition coefficient.

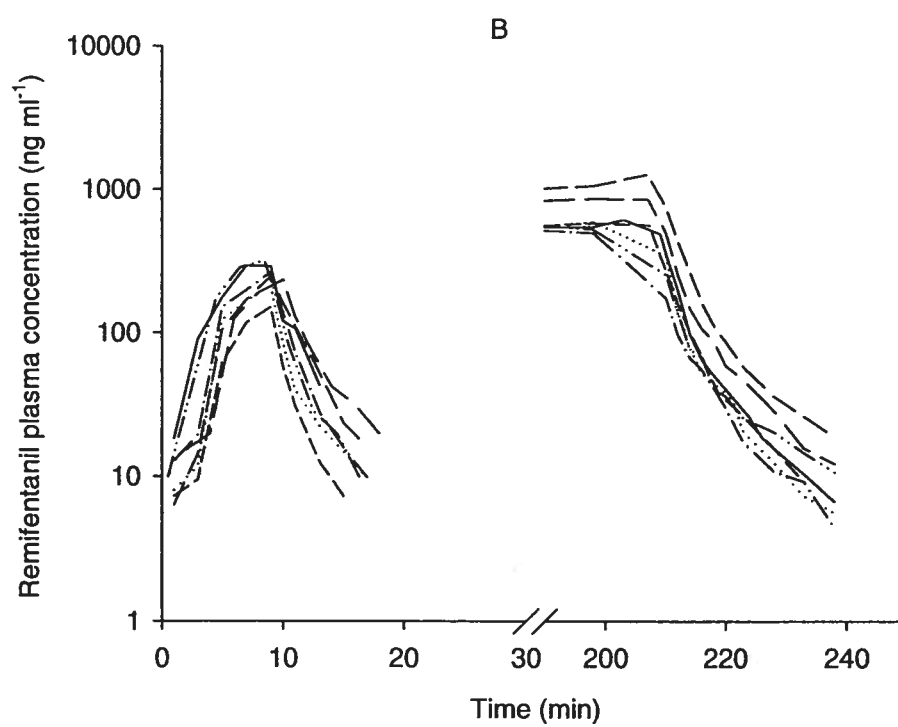
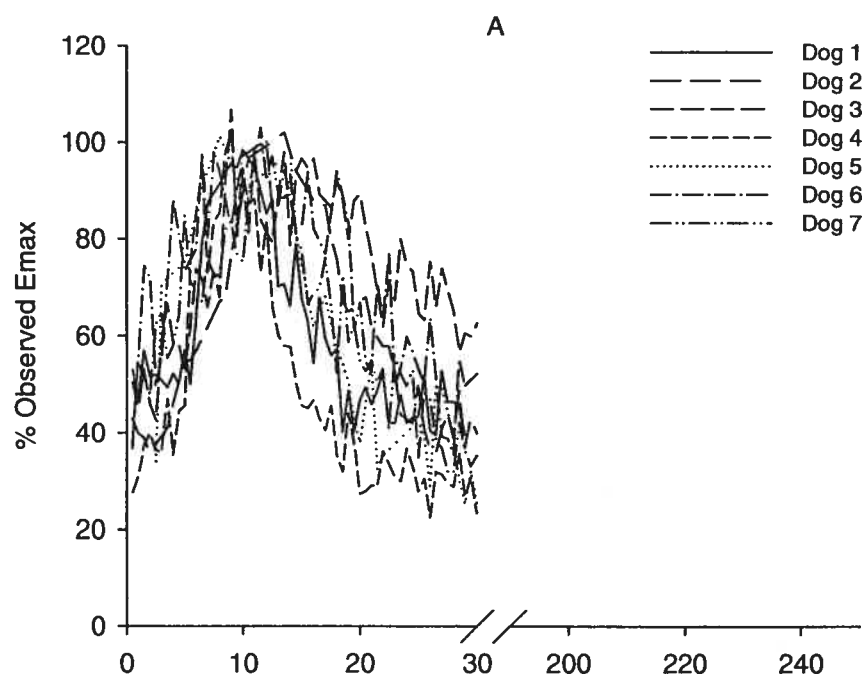
Animal preparation	PK-PD period	Washout period	Steady state period	PK period
--------------------	--------------	----------------	---------------------	-----------

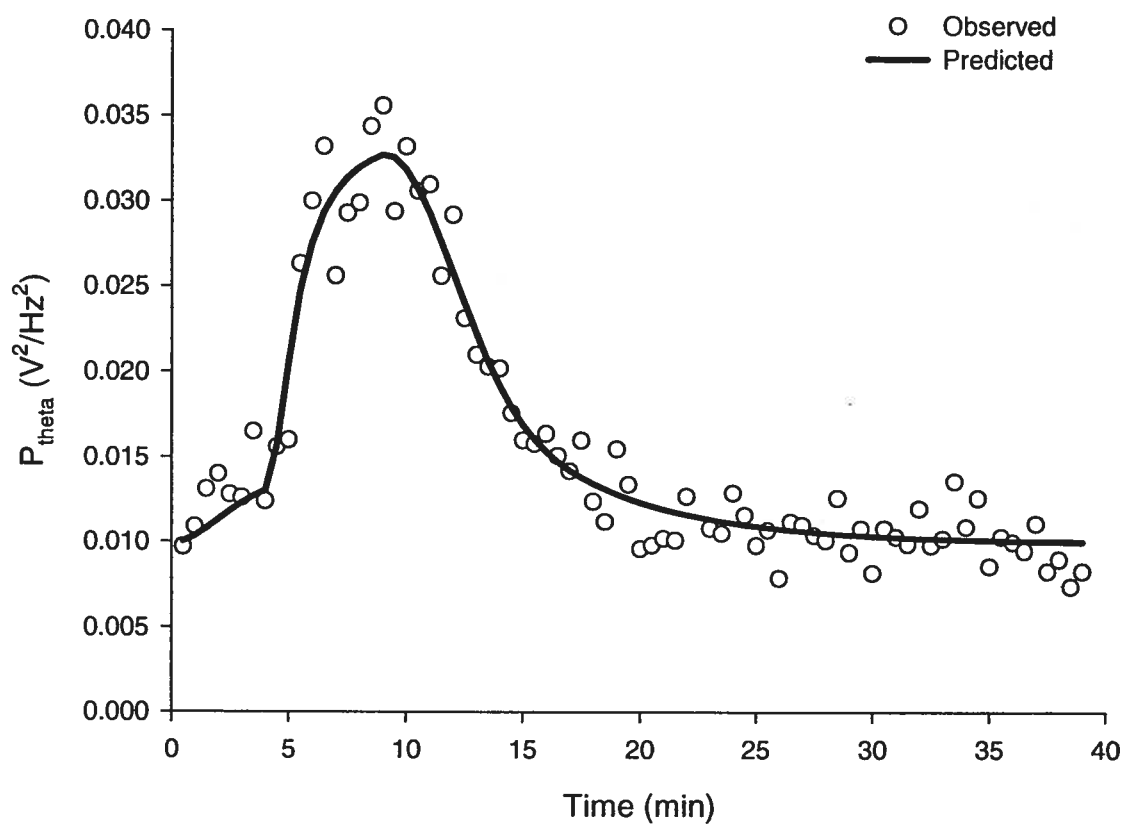


- EEG monitoring
- Arterial sampling

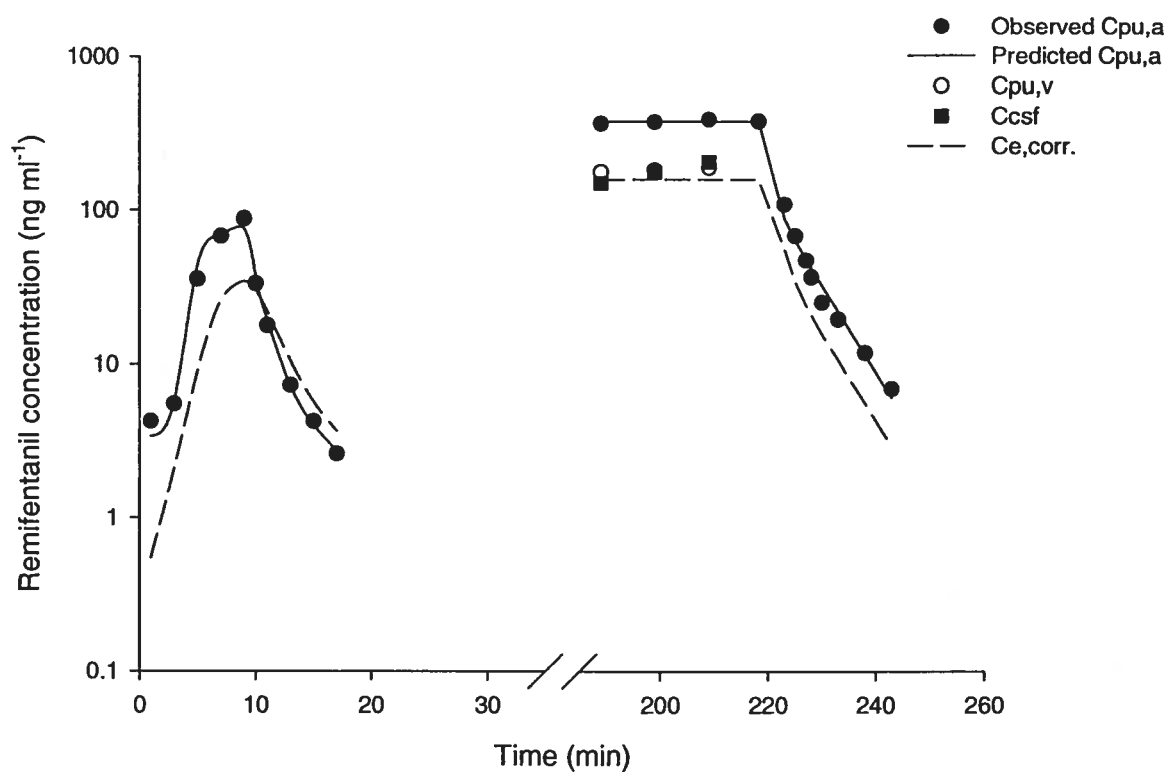
- A/V sampling
- CSF puncture

- Arterial sampling









**3. Impact of the peripheral elimination on the muscle interstitial concentrations of remifentanil in anaesthetized dogs: a proposed correction factor** [*British Journal of anaesthesia*]

By

Meriam Kabbaj<sup>1</sup>

Nobuharu Yamaguchi<sup>1</sup>

France Varin<sup>1</sup>

1. Faculté de pharmacie  
Université de Montréal

2. Faculté de médecine vétérinaire  
Université de Montréal

This research was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MA10274). A Canadian Institutes of Health Research-Research and development studentship was awarded to M.K. Remifentanil was provided by Abbott Laboratories.

**Acknowledgment.** The authors would like to thank Johanne Couture and Sanae Yamaguchi for their technical support.



### 3.1. Abstract

**Summary.** The aim of this study was to propose a correction factor for the peripheral concentrations derived by compartmental analysis for a drug undergoing tissue elimination. Arterial, venous, and interstitial fluid concentrations of remifentanyl were measured under steady state conditions and compared to those derived for the peripheral compartment.

**Methods.** A microdialysis technique was developed to determine remifentanyl unbound concentrations in the muscle interstitial fluid of dogs. After induction of anaesthesia, three microdialysis probes were inserted in the hindlimb muscles and equilibrated for 30 min. A 60 min-infusion of remifentanyl via the femoral vein was then started and interstitial fluid collected for two consecutive periods. Arterial and venous blood samples were drawn simultaneously at steady state after 30, 40 and 50 min. At the end of infusion, arterial blood and 5 min-microdialysate samples were collected for pharmacokinetic analysis. Exit site independent pharmacokinetic parameters were determined:  $V_1$  ( $142 \text{ mL kg}^{-1}$ ),  $Cl$  ( $63 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) and  $Cl_{21}$  ( $9.3 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ). A pharmacokinetic model assuming both central and peripheral elimination with the assumption that  $k_{20} = \beta$  gave the following exit-site dependent parameters:  $V_{ss}$  ( $713 \text{ mL kg}^{-1}$ ) and  $Cl_{12}$  ( $60 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ). The mean interstitial fluid concentration ( $319 \text{ ng mL}^{-1}$ ) represented 72 and 113 % of the arterial and venous blood, respectively. The steady state concentrations derived for the peripheral compartment ( $719 \text{ ng mL}^{-1}$ ), although higher than those measured in the muscle interstitial fluid ( $319 \text{ ng mL}^{-1}$ ), became quite similar ( $312 \text{ ng mL}^{-1}$ ) when corrected for the plasma unbound fraction (71 %) and muscle extraction (37 %).

**Conclusion.** These findings point out the impact of sampling site on the estimation of the pharmacokinetic parameters of remifentanyl.

**Keywords:** *Remifentanyl; arterio-venous gradient; muscle interstitial fluid; peripheral elimination*



### 3.2. Introduction

Remifentanil (RMF) is an ultra-short acting  $\mu$ -opioid analgesic susceptible to enzymatic hydrolysis.<sup>1</sup> The resulting acid (demethoxy-remifentanil) constitutes its major metabolite and is approximately 4600 times less potent than the parent drug in isoflurane-anaesthetized dogs.<sup>2</sup> Remifentanil undergoes widespread extra-hepatic metabolism by non-specific blood and tissue esterases. The muscle and intestines contribute significantly to the overall clearance of remifentanil in anaesthetized dogs.<sup>3</sup> Since remifentanil is metabolized at various rates in body tissues throughout the body, sampling site becomes crucial for pharmacokinetic studies.<sup>4</sup>

For drugs like remifentanil, non-organ based elimination may occur in both central and peripheral compartments. Microdialysis proved to be a suitable technique for the continuous measuring of unbound drug concentration in the extracellular space of living tissues, otherwise inaccessible.<sup>5-7</sup> It is therefore an interesting tool to evaluate the impact of peripheral elimination on tissue distribution equilibrium.

One of the major limitations when performing compartmental PK analysis is that the concentrations derived for the peripheral compartment do not change whether or not peripheral elimination is added to the model. The first objective of our study was to determine if a correction factor applied to the concentrations derived for remifentanil in the peripheral compartment would give a good approximation of those measured in the interstitial fluid of a tissue in which peripheral elimination is known to occur.

### 3.3. Materials and methods

#### 3.3.1. Chemicals

Remifentanil hydrochloride, demethoxy-remifentanil (GR90291), and the internal standard (I.S.) (GI97559) were provided by Glaxo-Wellcome (Stevenage, UK). The commercial preparation Ultiva<sup>®</sup> (5 mg-vial), was supplied by Abbott Laboratories (Montréal, Québec, Canada). All solvents were of HPLC grade and purchased from Anachemia (Montréal, Québec, Canada). All other chemicals were of analytical grade and purchased from Fisher Scientific (Montréal, Québec, Canada).

#### 3.3.2. Microdialysis system

Microdialysis probes of the concentric type with a polyether sulfone membrane (10 mm length, 35 KDa molecular weight cut-off, 0.6 mm outer diameter) were purchased from S.P.E (Concord, Ontario, Canada). Probes were linked to a syringe infusion pump (Harvard, Holliston, Ma) with a polyethylene tubing. Modified Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer (124 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 23 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucose) was weekly prepared, filtered and degassed with a mixture of 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub> to obtain a pH of 7.4. KRB buffer was used as the artificial interstitial fluid for both perfusate and reservoir medium.

#### 3.3.3. *In vitro* calibration study

All microdialysis *in vitro* experiments were carried out in a horizontal agitator (Eberbach) maintained at 37°C. The microdialysis probes were immersed in a 2 mL reservoir and continuously perfused at a flow rate of 2 µl min<sup>-1</sup>.



### 3.3.3.1. Relative recovery of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl

Microdialysis probes were immersed in a mixture of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl (1000 ng mL<sup>-1</sup>) in KRB and perfused with a KRB solution. Dialysates and reservoir medium were sampled every 30 min and were immediately analyzed. The relative recovery of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl over the dialysis membrane was evaluated for each probe and was expressed as the ratio of the dialysate concentration ( $C_{out}$ ) to the concentration in the reservoir medium surrounding the probe ( $C_r$ ):

$$RR(\%) = \frac{C_{out}}{C_r} \times 100 \quad (1)$$

with  $RR_{RMF}$  and  $RR_{demethoxy-RMF}$  being the relative recovery of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl, respectively.

### 3.3.3.2. Relative loss of demethoxy-remifentanyl

Microdialysis probes were immersed in a blank KRB solution and were continuously perfused with a solution of demethoxy-remifentanyl in KRB (1000 ng mL<sup>-1</sup>). Dialysates were collected every 30 min and immediately analyzed. Relative loss was calculated as:

$$RL(\%) = \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \times 100 \quad (2)$$

with  $C_{in}$  being the concentration of demethoxy-remifentanyl in the perfusate and  $RL_{demethoxy-RMF}$  its relative loss.



### 3.3.3.3. Delay for equilibrium

The required delay for equilibrium before sampling was investigated during the recovery experiments.

### 3.3.4. Animal preparation

Experimental procedures in this study adhered to the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Université de Montréal Animal Care and Ethics Committee. The *in vivo* experiment conducted in anaesthetized dogs is schematized in figure 1.

#### 3.3.4.1. Animals

Mongrel ( $n = 5$ ) and beagle ( $n = 2$ ) dogs (8.8-20 kg) were obtained from Biolab (Montréal, Québec, Canada). The animals were fasted overnight but allowed free access to water. On the day of the experiment, each dog was anaesthetized with an *iv* dose of sodium pentobarbital (Somnotol<sup>®</sup>, 30 mg kg<sup>-1</sup>). The monitoring level of anaesthesia was based on haemodynamic parameters (heart rate, systolic pressure, diastolic pressure) as well as the cornean reflex. Intermittent bolus doses (4 mg kg<sup>-1</sup>) were administered for maintenance of deep anaesthesia. Respiration was controlled through an endotracheal tube, with room air delivered by a respirator (model 607, Harvard, South Natick, MA). Body temperature was monitored and kept constant at 38°C by a thermoregulator (model 74, Yellow Springs Instruments, Yellow Spring OH) connected to a heating pad.

#### 3.3.4.2. Animal surgery

The right femoral vein was cannulated with polyethylene tube for remifentanyl and pentobarbital administration. Right femoral artery was cannulated for

blood sampling. A pressure transducer was connected to the arterial line cannula. A three-way stopcock was placed between the dog and the pressure transducer to allow a switch between blood pressure measurement and arterial blood sampling. Left femoral artery was exposed to monitor muscle blood flow using an electromagnetic ring (model FR-030T, Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Electrocardiogram leads were inserted subcutaneously into the right and left legs and arms. Haemodynamic parameters (heart rate, systolic pressure, diastolic pressure) were monitored using a polygraph system (model RM-6000, Nihon Kohden). In the left femoral vein an indwelling catheter (Cathelon®, Critikon, Tampa, Florida) was inserted to allow venous blood sampling.

#### **3.3.4.3. Microdialysis probe implantation**

Three small incisions were made in the skin of the left leg to expose the gracilis and the gastrocnemius muscles. A microdialysis probe introducer was inserted into the muscle tissue using a needle guide, the guide was then removed and the probe inserted through the introducer. The latter was removed leaving the microdialysis probe that was secured in place. Two probes were implanted in the gracilis muscle and one in the gastrocnemius. A half-hour equilibration time was allowed for the tissue to recover.

#### **3.3.4.4. *In vitro* protein binding**

The unbound concentration of remifentanyl was determined by ultrafiltration as described elsewhere <sup>8</sup>



### 3.3.5. *In vivo* probe calibration: reference period

After the stabilization period, probes were perfused with a solution containing demethoxy-remifentanyl ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) ( $C_{\text{in}}$ ). Sixty  $\mu\text{l}$  dialysate fractions leaving the probes were collected and frozen until HPLC analysis ( $C_{\text{out}}$ ). *In vivo* relative loss of demethoxy-remifentanyl from the probe into the muscle was calculated from the dialysate and the perfusate concentrations (see equation 2).

### 3.3.6. PK-PD study

Two short infusions of remifentanyl (infusion #1 and #2) were given to perform a PK-PD study. The results of this study are reported in a separate paper<sup>8</sup>. Arterial samples were drawn frequently up to 20 min after the second infusion ended.

### 3.3.7. Washout period

A washout period of approximately 120 min was allowed to ensure complete removal of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl from the probes. This was confirmed later by HPLC analysis of the dialysate.

### 3.3.8. Steady state period

Each dog received a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  bolus dose of remifentanyl Ultiva<sup>®</sup> via the right femoral vein, followed by a 60 min-infusion of  $40 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (infusion #3).



### **3.3.8.1. Microdialysis sampling**

Sixty  $\mu$ L dialysate fractions were collected over 30 min into plastic vials containing 1  $\mu$ L of citric acid 50% and stored frozen pending analysis.

### **3.3.8.2. Arterio-venous gradient**

At steady state, arterial (femoral) and venous (femoral) blood samples (3 mL) were simultaneously collected at 30, 40 and 50 min after remifentanyl infusion #3 started. Blood samples were collected into heparinized tubes maintained on ice and centrifuged within half an hour. Plasma was stored at -70°C until analysis. Plasma samples were assayed in duplicate and the mean of the two values was used.

### **3.3.9. Pharmacokinetic period**

At the end of remifentanyl infusion #3, arterial blood samples (3 mL) were collected 1 min before the infusion ended, then every 2 min for 15 min and finally every 5 min for 15 more minutes. A tissue pharmacokinetic was performed simultaneously by pooling the dialysates of the three probes. The collection time period was 5 min.

At the end of the experiment, dogs were sacrificed using a mixture of KCl and pentobarbital.

### **3.3.10. Sample analysis**

A selective and specific high performance liquid chromatographic method previously developed for the quantitation of remifentanyl in dog plasma was used.<sup>9</sup> Briefly, plasma samples (0.5 mL) were extracted on C-phenyl solid phase cartridges (Phenomenex, Torrance, CA). Separation was performed on a 5  $\mu$ m reversed-phase Spherisorb C<sub>1</sub> column (150 x 4.6 mm I.D.) purchased from Phenomenex (Torrance, CA). The mobile phase

contained 28% of organic solvent in 2.4 mM potassium phosphate buffer and was delivered at a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. UV detection was set at 210. Peak integration was performed using Star Chromatography Varian Software version 4.51 (Walnut Creek, CA).

Dialysates were directly injected onto the HPLC column without any extraction or filtration. External standard (GI97559) was added to the dialysates to correct for injection volume variation during HPLC analysis. Remifentanil and its metabolite in interstitial fluid were determined from calibration curves prepared in KRB. Intra- and inter-day accuracy and precision for both molecules were less than 8 % over the concentration range of 15.62 - 2000 ng mL<sup>-1</sup> in KRB.

### 3.3.11. Data analysis

#### 3.3.11.1. Retrodialysis by metabolite

The *in vivo* relative recovery of remifentanil ( $RR_{RMF, \text{exp}}$ ) and demethoxy-remifentanil ( $RR_{\text{demethoxy-RMF, exp}}$ ) was estimated in each dog using the relative loss of demethoxy-remifentanil ( $RL_{\text{demethoxy-RMF, ref}}$ ) that was determined during the reference period:

$$RR_{\text{exp}} = RL_{\text{demethoxy - RMF, ref}} \quad (3)$$

The *in vivo* relative loss of demethoxy-remifentanil for each probe during the reference period was then used to estimate unbound remifentanil concentrations in the interstitial space ( $C_{\text{ISF,u}}$ ), from the observed dialysate concentrations ( $C_{\text{out}}$ ). The following equation was used:

$$C_{\text{ISF,u}} = \frac{C_{\text{out}}}{RL_{\text{demethoxy - RMF, ref}}} \quad (4)$$



### 3.3.11.2. Arterio-venous gradient

The arterial concentrations ( $C_{p_{ss,a}}$ ) measured at three collection times were compared using the Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks. After statistical confirmation of steady state conditions, the three concentrations were averaged. Venous concentrations ( $C_{p_{ss,v}}$ ) were treated similarly and arterio-venous gradient (E) of remifentanil across the muscle was calculated using the mean values as follows:

$$E_{\text{muscle}} (\%) = \frac{C_{p_{ss,a}} - C_{p_{ss,v}}}{C_{p_{ss,a}}} \times 100 \quad (5)$$

### 3.3.11.3. Pharmacokinetic analysis

Pharmacokinetic parameters were derived individually using a two-compartment model with elimination from the central and peripheral compartments. Two consecutive zero order input rates followed two hours later by an *iv* bolus and a zero order input rate were applied using all the data points, including the PK-PD period. Goodness of fit was evaluated according to the Akaike's information criterion <sup>10</sup>. Pharmacokinetic analysis was based on iterative linear least square regression analysis using WinNonlin software (WinNonlin, Professionnal Edition version 1.5, Pharsight, Mountain View, Ca). A weighting function  $1/(\text{predicted } Y)$  was applied. When drug elimination from the peripheral compartment is added to a two compartmental model, a fourth rate constant is introduced. As the maximum number of solvable rate constants is three, the fourth rate constant (usually  $k_{20}$ ) has to be fixed to make the model identifiable. This was achieved as follows. The rate constant of formation of demethoxy-remifentanil in the muscle interstitial fluid was obtained from the change in concentration between the two collection periods performed under steady state conditions. For each dog, this rough estimate of the *in situ* hydrolysis of RMF by tissue esterases corresponded to the rate of elimination ( $\beta$ ). Accordingly, the assumption that  $k_{20}$  equals  $\beta$  was made in the model and the PK parameters calculated as previously described .<sup>11</sup>



Descriptive curve parameters (distribution ( $\alpha$ ) and elimination ( $\beta$ ) rate constants and their corresponding A and B coefficients) and PK exit-site independent parameters such as the volume of the central compartment ( $V_1$ ), and total body clearance (Cl) and intercompartmental clearance  $Cl_{21}$  were obtained. The exit-site dependent pharmacokinetic parameters namely, the first-order rate constant of elimination from the central compartment ( $k_{10,c+p}$ ), the first-order rate constants associated with drug transfer from compartment 1 to compartment 2 ( $k_{12,c+p}$ ) and from compartment 2 to compartment 1 ( $k_{21,c+p}$ ), the volume of distribution at steady state ( $V_{d_{ss,c+p}}$ ) and intercompartmental clearance ( $Cl_{12,c+p}$ ) were also derived.

#### 3.3.11.4. Peripheral compartment concentration

For each dog, the concentration-time curve of remifentanyl in the peripheral compartment ( $C_2$ ) was simulated using the general equation for the two-compartment model after an *iv* infusion:<sup>12</sup>

$$C_2 = \frac{k_{12} \times k_0}{V_2} \left[ \frac{(1 - e^{-\alpha T})}{\alpha \times (\beta - \alpha)} e^{-\alpha t'} + \frac{(1 - e^{-\beta T})}{\beta \times (\alpha - \beta)} e^{-\beta t'} \right] \quad (6)$$

Where,  $k_0$  is the infusion rate,  $V_2$ , the volume of the peripheral compartment ( $V_{d_{ss}} - V_1$ ),  $T$ , the time duration of each infusion, and  $t'$ , the time after infusion stops. In a previous paper, it was shown that the concentrations in the peripheral compartment do not change whether peripheral elimination is added or not to the model because there is a proportional increase in  $V_2$  and  $k_{12}$ <sup>11</sup>. The peripheral compartment concentrations derived at steady state ( $C_{2ss,corr.}$ ) were then corrected for the plasma unbound fraction and muscle extraction ( $C_{2ss,corr.}$ ):

$$C_{2ss,corr.} = C_{2ss} \times f_u \times (1 - E_{muscle}) \quad (7)$$

### 3.4. Results

After a period of equilibration of 30 min, the in vitro mean relative recoveries of remifentanyl and demethoxy-remifentanyl over the dialysis membrane remained stable for at least three hours and ranged between 61 and 79 % (Table 1). Similarly, the in vitro mean relative loss of demethoxy-remifentanyl ranged between 60 and 71 % (Table 1). During the reference period, the in vivo mean relative loss of demethoxy-remifentanyl obtained from three different probes in individual dogs was lower than the in vitro value and ranged from 10 – 22 % for both collection periods (n=6) (Table 2). The relative loss of demethoxy-remifentanyl over each corresponding fraction of the reference period was used to estimate the in vivo recovery of remifentanyl during steady state. The concentrations of remifentanyl in the dialysates were then corrected to estimate the real concentrations in the muscle interstitial fluid.

Baseline and steady state haemodynamic parameters (infusion #3) are reported in Table 3. Remifentanyl induced a rapid decrease in heart rate (from 110 to 70 bpm), and a proportional reduction in both arterial blood pressure (from 197/154 to 140/93 mm Hg) and muscle blood flow (from 6 to 4 mL min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>). Haematocrit remained stable throughout the experiment.

The concentration-time profile of remifentanyl in each dog was well described by a two compartment pharmacokinetic model. The resulting exit-site independent pharmacokinetic parameters for remifentanyl in anaesthetized dogs (mean ± SD) listed in Table 4 are identical to those published elsewhere.<sup>8</sup> The terminal elimination half-life was estimated to be 7.71 min. Table 5 summarizes the exit-site dependent pharmacokinetic parameters for remifentanyl.

Based on statistical analysis, arterial plasma concentrations were stable in each dog, during the three sampling periods (P=0.500). Venous concentrations were found to be consistently lower than arterial concentrations (Table 6). Mean femoral venous

concentration amounted to  $64 \pm 7\%$  of the mean arterial concentration ( $P = 0.005$ ), which represents a 37% gradient over the hindlimb muscles of anaesthetized dogs (Table 6).

For all dogs, remifentanil unbound interstitial fluid concentrations were estimated using retrodialysis with metabolite. During the steady state period, mean remifentanil concentrations in the dialysates were stable whereas those of demethoxy-remifentanil increased. For each dog, the rate of demethoxy-remifentanil formation, although a rough estimate, was in close agreement to the rate of elimination ( $\beta$ ), with a high coefficient of correlation ( $r^2 = 0.88$ , data not shown).

During steady state, the mean unbound concentration of remifentanil in muscle interstitial fluid ( $319 \text{ ng mL}^{-1}$ ) were lower than those in arterial blood ( $441 \text{ ng mL}^{-1}$ ) but quite similar to the venous ones ( $283 \text{ ng mL}^{-1}$ ). The mean concentrations of remifentanil predicted for the peripheral compartment ( $719 \text{ ng mL}^{-1}$ ) were higher than those measured in the muscle interstitial fluid (Table 6). When a correction factor was applied to  $C_{2,ss}$  accounting for muscle extraction and plasma unbound fraction, the resulting concentrations were almost identical to those in the interstitial fluid ( $319$  vs  $312 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (Table 6).

### 3.5. Discussion

Remifentanyl was used as a model drug for the study of the impact of peripheral elimination on the estimation of PK parameter of anaesthetic drugs. This study represents the first application of microdialysis to the measure of the interstitial fluid concentrations of remifentanyl in a tissue where elimination is known to occur. Under steady state conditions, a large gradient between the arterial and interstitial fluid concentrations of remifentanyl was observed in anaesthetized dogs. A pharmacokinetic model that accounts for peripheral elimination as well as a correction factor for the derived peripheral compartment concentrations are proposed.

When applying microdialysis to pharmacokinetics, determination of the *in vivo* recovery of a drug over the probe membrane is needed for an accurate estimation of the concentration of drug in the interstitial fluid of a given tissue. For that purpose, the retrodialysis by drug is a very simple and convenient method.<sup>13</sup> It is based on the diffusive loss of the drug of interest from the perfusion solution into the tissue surrounding the probe, during a reference period. However, this method was not appropriate for remifentanyl, as it would have implied its perfusion into the muscle, which represents a major site of metabolism. The relative recovery would have therefore accounted not only for remifentanyl recovery over the probe membrane but also for its muscular clearance. The major metabolite of remifentanyl, demethoxy-remifentanyl, differs from the parent drug by a methyl function; this explains why both compounds showed similar *in vitro* dialysis characteristics. Thus, it seemed quite reliable to use the metabolite for the *in vivo* calibration, assuming that both molecules would retain similar dialysis characteristics *in vivo*. However, the mean *in vivo* relative loss of demethoxy-remifentanyl proved to be significantly lower than its mean *in vitro* recovery (18% versus 68%). Such a difference was also observed for other drugs and attributed mostly to tissue resistance to drug diffusion.<sup>14-16</sup> This finding reinforces the importance of *in vivo* probe calibration.

In 5 out of 6 dogs, the muscle interstitial fluid concentrations of remifentanyl corresponding to the first collection period (first 30 min of infusion # 3) were lower than





those observed for the second period. This is why the latter was used as the reference value. During the first 30 min, the concentrations in the interstitial fluid ( $C_{isf}$ ) were quite close to those predicted for the peripheral compartment ( $C_{2,corr.}$ ) in most dogs. This good agreement, despite the imprecision introduced by the long period of collection, confirms the rapid transcapillary transfer of the unbound concentration of remifentanil in the extracellular fluid. Similar findings were observed for rocuronium<sup>17</sup> and gallamine<sup>18</sup> following an *iv* bolus dose.

Under steady state conditions, the concentrations measured in the interstitial fluid were slightly higher than those in venous blood concentrations but almost equivalent to  $C_{2,corr.}$  This indicates that the correction factor applied to the latter, namely, the unbound fraction of drug escaping to muscle extraction, is adequate as it represents the concentrations measured in the interstitial fluid. It is also, by definition, the freely diffusible concentration of drug that, under steady state conditions, should be equal in all compartments.

After stopping the infusion, remifentanil unbound concentrations measured in the muscle interstitial fluid declined monotonically and were almost 10 fold higher than those measured in the arterial bed. The  $C_{isf}$  were of the same order of magnitude and decreased in parallel with those derived for the peripheral compartment, after proper correction. This finding suggests that the transfer back into the vascular space was compensated by a rapid cellular efflux. This was not the case for gallamine<sup>18</sup>, where the muscle interstitial fluid and arterial plasma concentration time profile were almost superimposed during both the redistribution and elimination phases following a bolus injection. Thus, for hydrophilic drugs, the unbound concentrations in tissue interstitial fluid and arterial plasma would belong to the same kinetic pool.

Neglecting to include peripheral elimination in the mathematical model used to generate the PK parameters of a drug like remifentanil will lead to a gross underestimation of exit-site dependent parameters. To account for peripheral elimination, a pharmacokinetic approach was first proposed by Fisher<sup>19</sup> where the *in vitro* rate constant of degradation in plasma ( $k_{in vitro}$ ) is substituted to the peripheral elimination rate constant ( $k_{20}$ ) in a two

compartment model. More recently, an explanatory model was developed to assess the impact of various degrees of peripheral elimination on the estimation of exit-site dependent PK parameters for muscle relaxants.<sup>11</sup> A specific application was proposed where the *in vivo* elimination half-life ( $\beta$ ) measured in each patient would be assigned to  $k_{20}$  when  $\beta$  and  $k_{in\ vitro}$  have been shown to be similar in the same patient. This approach has been applied recently to succinylcholine in anaesthetized patients.<sup>20</sup> In preliminary studies, the mean *in vitro* degradation rate constants of remifentanyl in Krebs buffer, plasma and whole blood were found to be 0.007, 0.006 and 0.010 min<sup>-1</sup>, respectively, at pH 7.4 and 37°C (results not presented). These values are much slower than the *in vivo* elimination rate constant, confirming the data published by Davis *et al.*<sup>21</sup> In other respects, the rate constant of formation of demethoxy-remifentanyl that was determined during steady state in the muscular interstitial fluid provided a rough estimate of remifentanyl hydrolysis rate *in situ* and correlated very closely to the  $\beta$  value for each dog. Therefore, it appeared justified to assign the *in vivo* elimination rate constant to  $k_{20}$ . This assumption is consistent with the fact that tissue and not plasma esterases are mostly responsible for the hydrolysis of remifentanyl.

When a drug like remifentanyl undergoes widespread tissue metabolism, sampling site becomes a real issue for the estimation of its total body clearance. Our values are quite similar to those based on arterial sampling in isoflurane anaesthetized dogs<sup>2</sup> but are at least twofold lower than those estimated in dogs after venous sampling.<sup>3</sup> Similarly, Hermann and his collaborators studied the impact of sampling site on remifentanyl pharmacokinetic parameters in adult female volunteers after a 10-min infusion of remifentanyl.<sup>4</sup> Arterial and venous drug concentrations were treated simultaneously by a one-compartment venous model linked to the central arterial compartment, with elimination occurring from both central compartments (arterial and venous). Venous sampling was shown to overestimate the Cl and  $V_{ss}$  values by as much as 79 % and 282 %, respectively, when compared to their arterial counterparts. Their arterial  $V_{ss}$  (283 mL kg<sup>-1</sup>) value is quite similar to that calculated in our dogs when assuming central elimination only (228 mL kg<sup>-1</sup>).<sup>8</sup> On the other hand, their  $V_{ss}$  value derived with venous data (1083 mL kg<sup>-1</sup>) is of the same order of magnitude

of that calculated herein when central and peripheral elimination are assumed ( $713 \text{ mL kg}^{-1}$ ). These values are more compatible with the known intracellular distribution of the drug. Our experimental protocol did not allow for venous sampling after disruption of distribution equilibrium. However, in Herman et al's work, remifentanyl venous concentrations tended to be similar or slightly higher than the arterial concentration. Interestingly, the elimination rate derived for their venous compartment ( $k_{v0}$ ) was  $0.103 \text{ min}^{-1}$ , a value quite similar to that attributed herein to  $k_{20}$  (mean:  $0.097 \text{ min}^{-1}$ ). This provides further evidence that the value assigned to  $k_{20}$  is physiologically sound.

In a two-compartment model with central elimination only, the distributive clearances ( $Cl_{12}$ ,  $Cl_{21}$ ) are equal. When peripheral elimination is added to the model, the transfer of drug into the peripheral compartment ( $Cl_{12}$ ) becomes greater than the transfer back into the central compartment ( $Cl_{21}$ ); the latter value being identical to that obtained with a model assuming central elimination only. For remifentanyl, the impact of peripheral elimination on distributive clearance is impressive as it represents a six-fold increase in  $Cl_{12}$ .

In our dogs, the contribution of the metabolic clearance associated with the peripheral compartment ( $Cl_{20} = k_{20} \times V_2$ ) to the total body clearance was  $45 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ , contributing to as much as 71 % of the total body clearance of remifentanyl. This is in agreement with the high tissue extraction of remifentanyl observed in peripheral tissues such as the muscle (47 %) and intestines (45 %) of dogs under pentobarbital-barbital anaesthesia.<sup>3</sup>

The contribution of the muscle tissue to the overall clearance of remifentanyl was also calculated in our dogs by multiplying the femoral artery blood flow measured during steady state (corrected for plasma fraction), the percentage of muscle per kg of body weight in dogs (45.7 %) <sup>22</sup>, and the extraction of remifentanyl across the muscle tissue ( $E_{\text{muscle}} = 0.37$ ). The mean metabolic clearance of the muscle tissue ( $6 \text{ mL min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) accounted for 9.5 % of the total body clearance. If baseline values for the muscle blood flow were used for calculation, a higher contribution (15 %) would have been obtained. This latter estimate

is of the same order of magnitude of that reported in anaesthetized patients (16 %) for mivacurium, a drug exhibiting a similar extent of muscle extraction.<sup>23</sup>

Adding peripheral elimination in a two-compartment PK model bears a major limitation: it misjudges peripheral compartment concentrations. This is inherent to the basic assumption made when deriving the volume of the peripheral compartment, that is: at distribution equilibrium, the unbound concentrations in the central and peripheral compartments are equal.<sup>11</sup> As a result, drug concentration in the peripheral compartment is not allowed to change in presence of peripheral elimination. Our results prove that this mathematical assumption is flawed. Under steady state conditions, the unbound concentrations of remifentanil in the muscle interstitial fluid were lower than those in arterial blood (72 %) but higher than the venous ones (113 %). The muscle being an organ of elimination, arterial sampling should take into account tissue extraction after intravenous injection. When steady state concentrations in the peripheral compartment were derived on the basis of arterial concentrations, they were twofold higher than those measured in the interstitial fluid. A correction factor taking into account remifentanil unbound fraction in plasma and extraction by the muscle tissue allowed a good prediction of the peripheral concentrations derived from arterial data.

### 3.6. Conclusion

A pharmacokinetic model with peripheral elimination gave better estimates of remifentanyl steady state volume of distribution. For drugs undergoing peripheral elimination, the concentrations derived for the peripheral compartment are close to venous concentrations at steady state. Although compartmental models based on arterial sampling overestimates peripheral concentrations, a correction factor may be applied to account for tissue extraction and plasma protein binding.

Finally, very little attention is generally paid to peripheral concentrations because sampling of biological fluid in a tissue is difficult and mathematically-derived concentrations require to be validated. Indeed, the peripheral compartment is not an anatomical entity. Interpretation of data requires prior estimation of the degree of correlation between the concentrations in a particular tissue and those predicted for the peripheral compartment. Otherwise, interpretation is hazardous. For neuromuscular blocking agents, the muscle interstitial fluid would represent the biophase and drug hydrolysis within the muscle tissue would have definite implications on the PK-PD relationship. Further studies are warranted to address this issue.

### 3.7. Reference list

- 1 Feldman PL, James MK, Brackeen MF, Bilotta JM, Schuster SV, Lahey AP, Lutz MW, Johnson MR, Leighton HJ. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of ultrashort- to long-acting opioid analgetics. *J Med Chem* 1991; **34**: 2202-8
- 2 Hoke JF, Cunningham F, James MK, Muir KT, Hoffman WE. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl, its principle metabolite (GR90291) and alfentanil in dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **281**: 226-32
- 3 Chism JP, Rickert DE. The pharmacokinetics and extra-hepatic clearance of remifentanyl, a short acting opioid agonist, in male beagle dogs during constant rate infusions. *Drug Metab Dispos* 1996; **24**: 34-40
- 4 Hermann DJ, Egan TD, Muir KT. Influence of arteriovenous sampling on remifentanyl pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **65**: 511-8
- 5 de Lange EC, de Boer AG, Breimer DD. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; **45**: 125-48
- 6 Elmquist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 1997; **14**: 267-88
- 7 de la Pena A, Liu P, Derendorf H. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; **45**: 189-216
- 8 Kabbaj M, Vachon P, Varin F. Impact of the peripheral elimination on the concentration-effect relation of remifentanyl in anaesthetized dogs. *Br J Anaesth* (accepted for publication)
- 9 Kabbaj M, Varin F. Simultaneous solid-phase extraction with liquid chromatography with ultraviolet absorbance for the determination of remifentanyl and its metabolite in dog plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2003; **783**: 103-9
- 10 Holford NH, Sheiner LB. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet* 1981; **6**: 429-53



- 11 Laurin J, Nekka F, Donati F, Varin F. Assuming peripheral elimination: its impact on the estimation of pharmacokinetic parameters of muscle relaxants. *J Pharmacokinet Biopharm* 1999; **27**: 491-512
- 12 Colburn WA. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling. *J Pharmacokinet Biopharm* 1981; **9**: 367-88
- 13 Opezzo JA, Hocht C, Taira CA, Bramuglia GF. Pharmacokinetic study of methyldopa in aorta-coarctated rats using a microdialysis technique. *Pharmacol Res* 2001; **43**: 155-9
- 14 Yang H, Wang Q, Elmquist WF. Fluconazole distribution to the brain: a crossover study in freely-moving rats using in vivo microdialysis. *Pharm Res* 1996; **13**: 1570-5
- 15 Wang Y, Wong SL, Sawchuk RJ. Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus. *Pharm Res* 1993; **10**: 1411-9
- 16 Yokel RA, Allen DD, Burgio DE, McNamara PJ. Antipyrine as a dialyzable reference to correct differences in efficiency among and within sampling devices during in vivo microdialysis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992; **27**: 135-42
- 17 Ezzine S, Yamaguchi N, Varin F. Determination of interstitial rocuronium concentrations in the muscle tissue of anesthetized dogs by microdialysis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004; **49**: 121-9
- 18 Sasongko L, Ramzan I, Williams KM, McLachlan AJ. Muscle distribution of the neuromuscular blocker gallamine using microdialysis. *J Pharm Sci* 2002; **91**: 769-75
- 19 Fisher DM, Canfell PC, Fahey MR, Rosen JI, Rupp SM, Sheiner LB, Miller RD. Elimination of atracurium in humans: contribution of Hofmann elimination and ester hydrolysis versus organ-based elimination. *Anesthesiology* 1986; **65**: 6-12
- 20 Roy JJ, Donati F, Boismenu D, Varin F. Concentration-effect relation of succinylcholine chloride during propofol anesthesia. *Anesthesiology* 2002; **97**: 1082-92



- 21 Davis PJ, Stiller RL, Wilson AS, McGowan FX, Egan TD, Muir KT. In vitro remifentanyl metabolism: the effects of whole blood constituents and plasma butyrylcholinesterase. *Anesth Analg* 2002; **95**: 1305-7
- 22 Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health* 1997; **13**: 407-84
- 23 Ezzine S, Donati F, Varin F. Mivacurium arteriovenous gradient during steady state infusion in anesthetized patients. *Anesthesiology* 2002; **97**: 622-9





### 3.8. Figure legend

Figure 1. *In vivo* experimental protocol in pentobarbital anaesthetized dogs receiving different regimens of remifentanyl.

Figure 2. Plasma concentration-time profile of remifentanyl in a pentobarbital anaesthetized dog (#2). Markers represent the unbound arterial (●), venous (■) and muscle interstitial fluid (○) concentrations. Lines represent the predicted unbound arterial (—) concentrations and peripheral compartment (---) concentrations corrected for the unbound fraction and muscle extraction.

Table 1. *In vitro* relative recovery and relative loss of remifentanyl and demethoxy remifentanyl over the microdialysis membrane

Time min	Relative recovery (%)		Relative loss %	
	Remifentanyl	Demethoxy-remifentanyl	Demethoxy-remifentanyl	
0-30	46 ± 1	43 ± 1	25 ± 11	
30-60	64 ± 8	68 ± 20	60 ± 7	
60-90	71 ± 1	69 ± 10	71 ± 3	
90-120	69 ± 15	62 ± 14	62 ± 7	
120-150	72 ± 7	61 ± 2	62 ± 8	
150-180	75 ± 4	79 ± 13	64 ± 6	

\* Results represent the mean ± SD of three different experiments

Table 2. *In vivo* relative loss of demethoxy-remifentanil in pentobarbital anaesthetized dogs

dog	Relative loss of demethoxy-remifentanil	
	0-30 min	30-60 min
1	17 ± 4	15 ± 9
2	20 ± 1	21 ± 8
3	19 ± 4	20 ± 3
4	26 ± 7	22 ± 4
5	22 ± 1	10 ± 3
6	12 ± 4	13 ± 5

\* Results represent the mean ± SD of three different probes

Table 3. Physiological parameters at baseline and during remifentanyl steady state conditions in pentobarbital anaesthetized dogs

Dogs	Weight (kg)	Haematocrit (%)		Arterial pressure (mm Hg)		Heart rate (bpm)		Muscle blood flow (ml min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> )	
		Baseline	Steady-state	Baseline	Steady-state	Baseline	Steady-state	Baseline	Steady-state
1	11.0	30	31	190 / 170	120 / 100	152	75	4.8	3.6
2	20.0	40	37	210 / 170	140 / 90	124	65	6.2	3.8
3	19.8	41	41	180 / 140	130 / 70	110	70	5.3	3.9
4	17.6	36	36	200 / 180	140 / 110	100	61	5.0	2.7
5	13.6	35	36	250 / 160	160 / 100	110	70	4.9	4.2
6	12.2	40	39	180 / 140	150 / 100	86	69	6.3	3.7
7	8.8	38	35	170 / 120	140 / 80	90	80	9.5	4.5
<b>Mean</b>	<b>14.7</b>	<b>36</b>	<b>36</b>	<b>197 / 154</b>	<b>140 / 93</b>	<b>110</b>	<b>70</b>	<b>6.0</b>	<b>3.8</b>
<b>S.D.</b>	<b>4.4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>27 / 21</b>	<b>13 / 14</b>	<b>22</b>	<b>6</b>	<b>1.7</b>	<b>0.6</b>

Table 4. Exit-site independent pharmacokinetic parameters of remifentanyl in pentobarbital anaesthetized dogs

Dog	Descriptive curve parameters				PK parameters		
	A ng ml <sup>-1</sup>	B ng ml <sup>-1</sup>	$\alpha$ min <sup>-1</sup>	$\beta$ min <sup>-1</sup>	V <sub>1</sub> ml kg <sup>-1</sup>	Cl ml min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	Cl <sub>21</sub> ml min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>
1	12.80	0.28	0.449	0.087	180	71	7.6
2	15.88	0.88	0.413	0.092	131	46	6.7
3	35.48	0.93	0.296	0.061	133	36	2.7
4	38.07	3.11	0.865	0.129	117	71	12.9
5	29.52	1.97	0.532	0.115	159	69	11.2
6	37.57	1.76	0.801	0.118	120	77	15.4
7	26.46	0.79	0.551	0.077	152	71	8.5
<b>Mean</b>	<b>27.97</b>	<b>1.39</b>	<b>0.558</b>	<b>0.097</b>	<b>142</b>	<b>63</b>	<b>9.3</b>
S.D.	10.26	0.96	0.206	0.025	23	16	4.2
C.V.	37	69	37	25	16	25	46

A,  $\alpha$ , coefficient and initial distribution rate constant; B,  $\beta$ , coefficient and terminal elimination rate constant; V<sub>1</sub>, apparent volume of distribution in the central compartment; Cl, total body clearance; Cl<sub>21</sub> intercompartmental clearance.

Table 5. Exit-site dependent pharmacokinetic parameters of remifentanil in pentobarbital anaesthetized dogs <sup>a</sup>

Dog	Microconstants				PK parameters		
	$k_{12,c+p}$ min <sup>-1</sup>	$k_{21,c+p}$ min <sup>-1</sup>	$k_{10,c+p}$ min <sup>-1</sup>	$k_{20,c+p}$ min <sup>-1</sup>	$V_{ss,c+p}$ ml kg <sup>-1</sup>	$V_{2,ss,c+p}$ ml kg <sup>-1</sup>	$Cl_{12,c+p}$ ml min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>
1	0.344	0.012	0.093	0.080	851	671	62
2	0.305	0.017	0.091	0.092	851	366	40
3	0.230	0.006	0.060	0.006	592	459	31
4	0.679	0.056	0.130	0.129	546	429	79
5	0.389	0.026	0.117	0.115	596	437	62
6	0.645	0.030	0.124	0.118	642	522	78
7	0.453	0.014	0.083	0.061	911	759	69
<b>Mean</b>	<b>0.435</b>	<b>0.023</b>	<b>0.100</b>	<b>0.086</b>	<b>713</b>	<b>520</b>	<b>60</b>
S.D.	0.170	0.017	0.025	0.042	152	143	18
C.V.	39	73	25	49	21	27	31

<sup>a</sup> Calculations of the parameters was based on the assumption that  $k_{20}$  equals  $\beta$

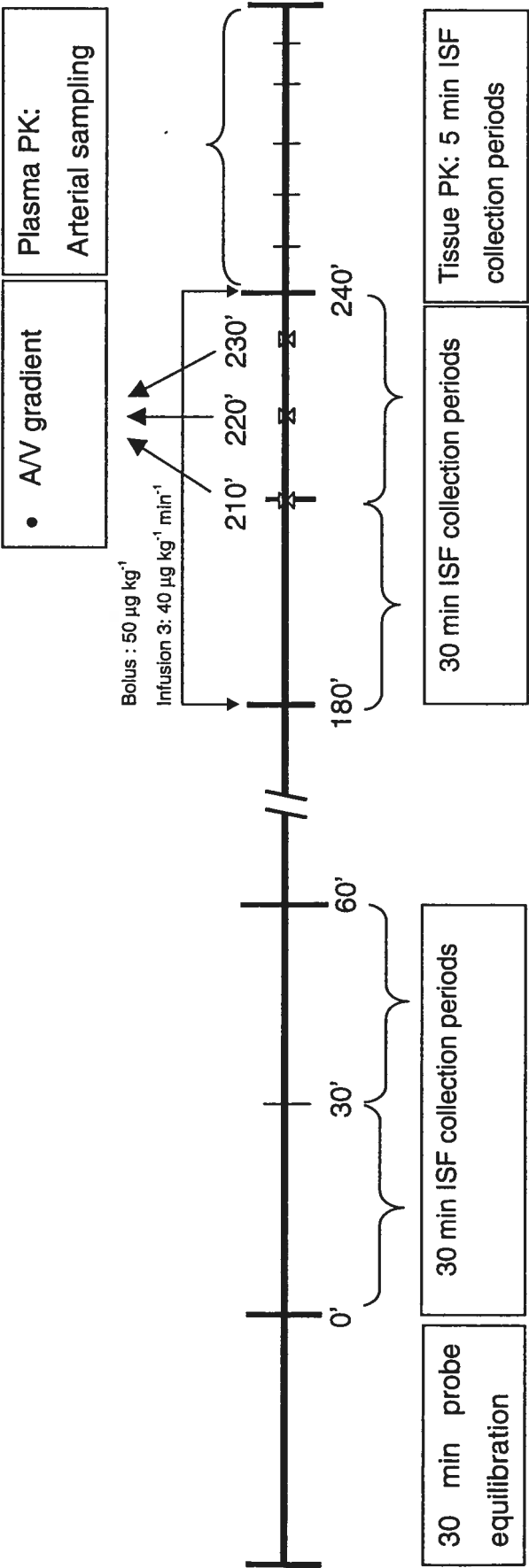
$k_{12,c+p}$ , transfer rate constant from the first to the second compartment;  $k_{21,c+p}$ , transfer rate constant from the second to the first compartment;  $k_{10,c+p}$ , elimination rate constant from compartment 1;  $k_{20,c+p}$ , elimination rate constant from compartment 2;  $V_{ss,c+p}$ , apparent volume of distribution at steady state;  $V_{2,ss,c+p}$ , apparent volume of distribution in the peripheral compartment derived from  $V_{ss}$ ;  $Cl_{12}$  intercompartmental clearance.

Table 6. Comparison of measured arterial, venous and interstitial fluid concentrations to derived peripheral concentrations of remifentanyl under steady state conditions in anaesthetized dogs

Dog	$f_{u,p}$ %	$E_{\text{muscle}}$ %	$C_{p_{ssu,a}}$ ng ml <sup>-1</sup>	$C_{p_{ssu,v}}$ ng ml <sup>-1</sup>	$C_{\text{ISF}}$ ng ml <sup>-1</sup>	$C_{2ss}$ ng ml <sup>-1</sup>	$C_{2ss,corr.}$ ng ml <sup>-1</sup>
1	65	39	358	219	256	531	211
2	61	37	508	321	376	774	298
3	70	29	701	497	486	1063	528
4	69	51	386	188	191	817	276
5	68	41	375	220	257	585	235
6	83	28	378	272	350	541	323
7	81	31	383	264	ND	656	366
<b>Mean</b>	<b>71</b>	<b>37</b>	<b>441</b>	<b>283</b>	<b>319</b>	<b>719</b>	<b>312</b>
S.D.	8	8	125	104	106	208	114
C.V.	11	22	28	37	33	29	36

$F_{u,p}$ , free fraction in plasma;  $E_{\text{muscle}}$ , muscle extraction;  $C_{p_{ssu,a}}$ , steady state unbound arterial concentrations;  $C_{p_{ssu,v}}$ , steady state unbound venous concentrations;  $C_{\text{ISF}}$ , steady state muscle interstitial fluid concentrations;  $C_{2ss}$ , steady state peripheral compartment concentrations;  $C_{2ss,corr.}$ , steady state effect compartment concentrations corrected for plasma protein binding and muscle extraction.

Animal preparation	Reference period <i>In vivo</i> probe calibration (demethoxyv-remifentanyl)	PK-PD study	Wash out period	Steady state period	PK study
--------------------	---	-------------	-----------------	---------------------	----------



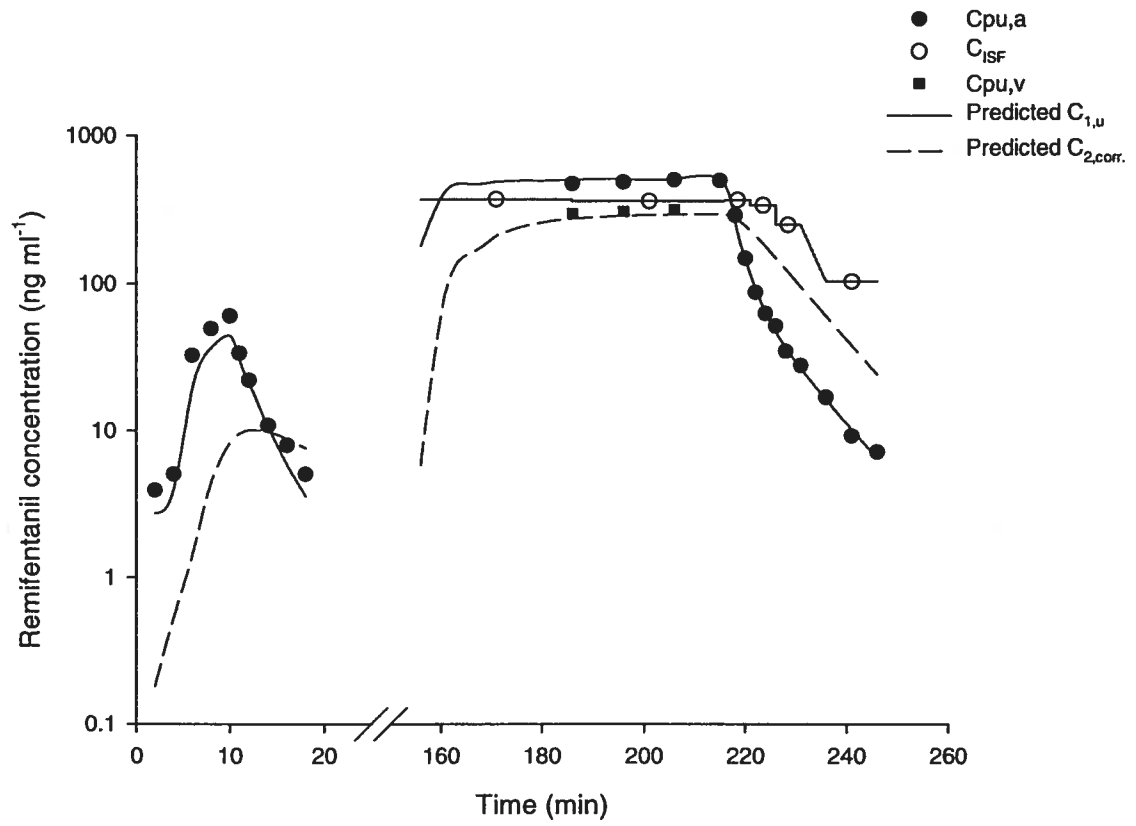
30 min probe equilibration

30 min ISF collection periods

30 min ISF collection periods

Tissue PK: 5 min ISF collection periods





**CHAPITRE 3**  
**DISCUSSION GÉNÉRALE**

La présupposition selon laquelle les concentrations dans les différents compartiments sont égales à l'équilibre, est le fondement même de l'approche pharmacocinétique compartimentale traditionnelle. L'égalité du transfert de masse qui en découle, permet de dériver le volume de distribution du compartiment périphérique ( $V_2$ ) et les microconstantes des vitesses de transfert. La concentration de médicament dans le compartiment périphérique est obtenue subséquemment en divisant la quantité de médicament  $X_2$  par  $V_2$ . Lorsque des molécules sont soumises à une hydrolyse à la fois centrale et tissulaire, on introduit une quatrième microconstante de transfert,  $k_{20}$ , pour tenir compte de l'élimination périphérique. Or, on observe qu'en remplaçant les nouvelles valeurs de  $k_{12}$  et  $V_2$  dans l'expression de la concentration dans le compartiment périphérique, celle-ci ne varie pas, quelle que soit la valeur attribuée à  $k_{20}$ <sup>1</sup>. Cette aberration est inhérente à la présupposition de base, qui ne semble plus adaptée pour des molécules soumises à une hydrolyse à la fois centrale et tissulaire. Par conséquent, il est crucial de comprendre en quoi les modèles compartimentaux avec ou sans élimination périphérique peuvent encore décrire adéquatement le devenir de tels médicaments.

Ce travail de recherche est présenté à travers trois manuscrits faisant l'objet des chapitres précédents. Il vise à élucider l'équilibre de distribution des médicaments soumis à une élimination tissulaire en utilisant le RMF comme molécule modèle. La discussion qui en résulte s'articule autour de trois thèmes principaux décrivant d'une part, le métabolisme et la stabilité du RMF *in vitro* et d'autre part, les méthodologies employées en vue de l'analyse biologique, l'échantillonnage dans le compartiment périphérique et l'étude pharmacodynamique. Enfin, à l'issue des résultats de l'étude *in vivo*, nous discuterons de l'impact d'une extraction tissulaire dans la biophase et le compartiment périphérique sur l'estimation des paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques du RMF.



## 1. Études *in vitro*

### 1.1. Métabolisme du RMF *in vitro*

Du fait que le temps de demi-vie du RMF soit très court *in vivo*, la littérature suggère de nombreuses précautions pour maintenir l'intégrité du principe actif *ex vivo*. Mais qu'en est-il vraiment de sa stabilité *in vitro*? Le RMF a été incubé à 37°C dans du tampon Krebs, du plasma, du sang entier et de l'homogénat musculaire afin d'évaluer sa vitesse d'hydrolyse *in vitro*. Ces résultats n'ayant pas été rapportés dans les publications, sont résumés dans le tableau 1. La dégradation de nature strictement chimique observée dans le tampon Krebs (98 min) est comparable sinon plus rapide que celle dans le plasma (108 min), indiquant que les butyrylcholinestérases plasmatiques ne sont pas responsables du métabolisme du RMF. Manullang et Egan ont également noté que les effets cliniques du RMF ne sont pas prolongés chez des patients présentant une déficience des butyrylcholinestérases plasmatiques<sup>66</sup>. De plus, les temps de demi-vie d'hydrolyse les plus courts de 31 et 72 min sont observés respectivement dans l'homogénat musculaire et le sang. Ils sont attribués aux estérases non spécifiques présentes dans le muscle et les érythrocytes. Bien que le muscle représente un des principaux organes responsables du métabolisme du RMF, la vitesse d'hydrolyse mesurée dans l'homogénat ne permet pas d'expliquer un temps de demi-vie *in vivo* d'environ 10 min. On peut supposer que les débris tissulaires engendrés par l'homogénéisation du muscle influencent la liaison aux protéines et protègent ainsi le RMF d'une éventuelle dégradation enzymatique. Une hypothèse similaire a été émise dans une étude traitant du métabolisme du RMF, où l'on rapporte que sa vitesse d'hydrolyse dans le tampon est supérieure à celle mesurée dans le plasma<sup>65</sup>.



Tableau 1. Temps de demi-vie du RMF incubé à 37°C dans différents milieux

Temps demi-vie du RMF (min)				
	Krebs	Plasma	Sang complet	Homogénat musculaire
Moyenne	98	108	72	31
S.D.	10	7	4	2
C.V. %	10	7	6	7

### 1.2. Stabilité *ex vivo* du RMF dans le sang complet

L'unique argument avancé pour justifier l'analyse du RMF dans le sang entier repose sur le caractère labile de la molécule *in vivo*. Les échantillons sanguins doivent être immédiatement stabilisés avec l'acide citrique ou un inhibiteur des estérases, l'écothiophate, pour minimiser le temps de contact avec les enzymes et éviter l'hydrolyse du RMF. Comme notre objectif était de développer une méthode analytique dans le plasma en vue de l'analyse PK-PD, nous avons d'abord testé la stabilité du RMF dans des échantillons de sang afin d'estimer le temps disponible pour prélever les plasmas et les stabiliser à -70°C. Les résultats ont démontré que les concentrations de RMF dans les échantillons sanguins maintenus sur glace demeurent inchangées pendant au moins 4h. Dans ces conditions, l'acide citrique et l'écothiophate ne sont pas nécessaires pour préserver l'intégrité de la molécule. D'autre part, nous avons constaté qu'en acidifiant au préalable les échantillons sanguins, le RMF se transforme majoritairement sous sa forme ionisée de sorte que le transfert vers les globules rouges est limité et les concentrations plasmatiques sont surestimées de 30%. Enfin, la stabilité du RMF *ex vivo* a également été testée dans un échantillon sanguin préalablement incubé à 37°C puis mis sur glace. La température de l'échantillon atteint 5°C après une durée de 20 min pendant laquelle le RMF demeure stable. Ces résultats de stabilité réfutent le seul argument qui justifiait jusqu'à présent, le dosage du RMF dans le sang complet.

### 1.3. Coefficient de partage globules rouges-plasma

Le coefficient de partage globules rouges-plasma a été calculé *ex-vivo*, en incubant le RMF dans le sang à 37°C. On observe que le coefficient de partage demeure proche de l'unité malgré l'hydrolyse encourue dans les érythrocytes. Ces résultats suggèrent que l'équilibre du RMF entre les globules rouges et le plasma est quasi-instantané.

Pour simuler les concentrations de RMF dans le sang total, les concentrations plasmatiques mesurées ont été corrigées en tenant compte du coefficient de partage globules rouges-plasma et de l'hématocrite. Les paramètres pharmacocinétiques résultants avoisinent ceux obtenus après une analyse des concentrations plasmatiques sans correction préalable. Ceci provient du fait que le coefficient de partage du RMF est proche de un. En revanche, pour un médicament dont le coefficient de partage globules rouges-plasma serait différent de l'unité, l'estimation de paramètres tels que la clairance, le volume central de distribution et le volume de distribution à l'équilibre serait erronée. De plus, d'un point de vue pharmacodynamique, une erreur importante pourrait être commise sur la valeur de la  $EC_{50}$ . Ces observations démontrent l'importance de la matrice d'analyse lorsqu'on compare les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de plusieurs médicaments.

## 2. Méthodologies

### 2.1. Bio-analyse

Notre premier objectif était de développer une méthode analytique pour doser simultanément le RMF et son métabolite dans le plasma, en vue d'élaborer un protocole pour une étude de pharmacodynamie chez le chien. En effet, on considère que seule la fraction plasmatique libre diffuse vers les récepteurs. Bien que le métabolite ne présente que peu d'intérêt d'un point de vue pharmacologique, il permet de fournir des indications sur la disposition du RMF dans l'organisme.



Plusieurs méthodes ont été développées pour quantifier le RMF ou son métabolite. On peut citer la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse <sup>19,21</sup>, la chromatographie en phase liquide <sup>18,22</sup> ainsi que la spectrométrie de masse en tandem <sup>23</sup>. La plupart d'entre elles étant basées sur une extraction liquide / liquide nous avons d'abord essayé de trouver un solvant organique qui permette d'extraire à la fois le RMF et le déméthoxy-RMF. Une étude mentionne l'extraction du RMF avec le chlorure de *n*-butyle suivi d'une extraction en retour par l'acide chlorhydrique <sup>18</sup>. Cette procédure a permis, en effet, une bonne récupération du RMF (88%) mais elle s'est avérée médiocre pour l'extraction du métabolite. En employant un solvant plus polaire, le chlorure de méthylène <sup>19,21</sup>, nous avons amélioré la récupération du déméthoxy-RMF qui demeurerait néanmoins modeste (50%). Il restait à considérer l'option d'une extraction sur un support solide. La seule méthode publiée était celle de Hoke et ses collaborateurs mais elle ne permettait pas de doser simultanément le RMF et son métabolite <sup>20</sup>. Elle utilise des supports C<sub>8</sub> qui n'assurent pas une bonne rétention des deux molécules lors de l'étape de lavage, quelle que soit la nature du solvant. C'est en choisissant un support d'extraction présentant des groupements plus polaires (C<sub>1</sub> ou C<sub>phenyl</sub>) que nous avons obtenu une récupération à la fois totale (106-101%) et reproductible du RMF (C.V. <8%). La récupération du déméthoxy-RMF bien que légèrement inférieure, était toutefois satisfaisante (77-80%) et reproductible (C.V. <6%).

La colonne chromatographique de phase inverse type C1 a permis une très bonne résolution entre le métabolite, le RMF et le standard interne. Les temps de rétention moyens étaient respectivement de 3,7-4,5, 8,3-9,4 et 9,8-11 min et le temps d'une analyse complète ne dépassait pas 15 min. Il arrivait qu'un petit pic provenant d'une substance endogène interfère avec celui du métabolite, mais ce problème a été résolu lors du traitement des chromatogrammes en forçant l'intégration du pic à la ligne de base de part et d'autre.

La limite de détection sur colonne était respectivement de 0,5 et 0,2 ng/mL pour le RMF et le déméthoxy-RMF. La limite inférieure de quantification dans le plasma était de 7,81 ng/mL pour le RMF et de 15,62 ng/mL pour le déméthoxy-RMF. Les rapports

correspondants représentaient trois fois la valeur du bruit de fond provenant de la matrice biologique. La sensibilité de notre méthode est comparable à celle décrite par Selinger et ses collaborateurs qui emploient la chromatographie en phase liquide couplée à l'UV après une extraction liquide/liquide du RMF <sup>18</sup>. Dans ces conditions la marge analytique validée est comprise entre 10 à 60135 ng/mL chez le chien, 1 à 200 ng/mL chez l'Homme et 2,5 à 250 ng/mL chez le rat. Il est évident que la chromatographie gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse démontre une plus grande sensibilité pour le dosage du RMF (0,1 ng/mL) <sup>19</sup> et du déméthoxy-RMF (1 ng/mL) <sup>21</sup> dans le sang humain. Toutefois, notre méthode pourrait facilement être adaptée à la spectrométrie de masse de haute résolution afin de répondre aux exigences de sensibilité requises pour les études cliniques.

En résumé, la méthode analytique que nous avons développée a permis l'extraction simultanée du RMF et de son métabolite sur un support solide à partir d'une matrice plasmatique et a amélioré la rapidité d'exécution sans sacrifier la précision, la sensibilité et la sélectivité. Ainsi, le RMF peut désormais être comparé à ses analogues, généralement dosés dans le plasma, notamment pour établir les puissances relatives de chacun.

## 2.2. Microdialyse

La microdialyse est une méthode de choix pour échantillonner le liquide interstitiel dans le muscle, pendant la perfusion de RMF chez le chien anesthésié. C'est ainsi qu'on a mesuré les concentrations de l'opioïde et de son métabolite à l'équilibre, dans un organe à travers lequel l'extraction du RMF est importante.

Pour que la microdialyse fournisse une mesure quantitative, il est nécessaire de calibrer les sondes afin de connaître le pourcentage de récupération de la molécule à travers la membrane de dialyse. Ce facteur est essentiel pour corriger la concentration dans les dialysats recueillis ( $C_{out}$ ) et en déduire la concentration réelle du médicament dans le tissu. Cependant, le pourcentage de récupération calculé *in vitro* n'est souvent pas représentatif de la valeur *in vivo* à cause de tous les phénomènes physiologiques qui influencent la diffusion de la drogue et dont on ne peut tenir compte. On a observé, en effet, que le





pourcentage de récupération du déméthoxy-RMF *in vitro* (68%) était supérieur à celui mesuré *in vivo* (18%). Plusieurs études montrent également que la récupération *in vitro* est en général surestimée<sup>160,175,323</sup>. La calibration des sondes de microdialyse *in vivo* paraît donc primordiale pour extrapoler le plus exactement possible les concentrations de RMF et de déméthoxy-RMF dans le liquide interstitiel à partir des dialysats échantillonnés.

La méthode de calibration *in vivo* dite de «no-net-flux», consiste à perfuser la sonde de microdialyse avec différentes concentrations de la molécule étudiée puis à déterminer pour chacune, les différences de concentration entre la solution perfusée et le dialysat. Comme cette méthode s'applique uniquement dans des conditions d'équilibre, elle est longue et par conséquent peu avantageuse lorsque les animaux sont maintenus sous anesthésie. La méthode de rétrodialyse inverse a donc été sélectionnée pour la calibration des sondes *in vivo*.

Pour notre étude, il a fallu adapter cette méthode puisque le RMF est essentiellement métabolisé dans le muscle et l'estimation de sa perte relative *in vivo* aurait inévitablement été erronée. Par conséquent, après avoir vérifié *in vitro* que le RMF possédait des propriétés de dialyse identiques au déméthoxy-RMF, ce dernier fut sélectionné pour la rétrodialyse *in vivo*. Les deux molécules possèdent effectivement une structure chimique qui se différencie uniquement par une fonction méthyle. De fait, leur récupération à travers la membrane de dialyse *in vitro* était similaire (70% pour le RMF et 68% pour le déméthoxy-RMF) et la récupération du premier (70%) était comparable à la perte du second *in vitro* (64%). Ces résultats suggèrent que la substitution du RMF par le déméthoxy-RMF représente une alternative fiable pour la calibration des sondes *in vivo*, en assumant bien entendu que le RMF et le déméthoxy-RMF démontrent des propriétés de dialyse *in vivo* identiques.

L'inconvénient majeur de cette méthode de calibration repose sur le fait que le pourcentage de récupération estimé avant l'administration du médicament ne tient pas compte des événements pouvant affecter la diffusion pendant la période expérimentale



(changement de la circulation régionale, protéines et débris cellulaires adsorbés sur la membrane des sondes...). La méthode de rétro dialyse combinée propose d'y remédier en utilisant un calibrateur dont le rôle s'apparente à celui d'un standard interne en chromatographie. Elle implique une période de référence pendant laquelle le médicament (ou dans notre cas le métabolite) et le calibrateur sont perfusés dans la sonde de microdialyse.

La principale difficulté de cette méthode réside dans le choix du calibrateur. En règle générale, ce dernier s'apparente le plus possible à la molécule étudiée pour que les propriétés de dialyse soient semblables. Dans notre étude, il fallait tenir compte du fait que le RMF était mesuré à l'équilibre dans des conditions où les transferts membranaires s'annulent. Pour reproduire ces conditions, nous avons choisi une petite molécule polaire, l'acide monoquaternaire de l'atracurium, qui ne diffuse pas facilement à travers les bicouches membranaires et reste localisé dans l'espace extracellulaire entourant la sonde. *In vitro*, l'acide monoquaternaire de l'atracurium semblait être un bon calibrateur puisque le pourcentage de perte relative à travers la membrane de microdialyse était similaire à celui du déméthoxy-RMF et du RMF. Cependant, les expériences *in vivo* ont montré que pour trois chiens (#2, #4 et #5), ce pourcentage diminuait considérablement au cours de l'expérience allant même jusqu'à s'annuler dans certains cas. Cette observation ne pouvait être attribuée à une dégradation des conditions de diffusion car les concentrations du RMF et de son métabolite étaient stables et reproductibles pour les trois sondes insérées. L'acide monoquaternaire de l'atracurium ayant été perfusé pendant plusieurs heures, il est probable qu'un phénomène de saturation du milieu environnant fut à l'origine de la diminution de la récupération relative au cours du temps. Par conséquent, ce paramètre n'était pas assez robuste pour la calibration des sondes de microdialyse *in vivo*. Avec les chiens 1, 3 et 6 nous avons obtenu le même estimé des concentrations interstitielles en utilisant la rétro dialyse combinée avec l'acide monoquaternaire de l'atracurium ou la rétro dialyse par le métabolite. Cela démontrait que les conditions expérimentales étaient suffisamment stables pour utiliser cette dernière méthode de manière fiable.



## 2.3. Mesures pharmacodynamiques

### 2.3.1. Pupillométrie

En vue de mener une étude PK-PD chez le chien anesthésié, il nous semblait crucial de choisir un paramètre clinique qui caractérise la pharmacodynamie du RMF. Les paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque) sont souvent imprécis et peu spécifiques. De plus, en suivant l'activité cérébrale nous n'étions pas certain de pouvoir discriminer l'effet du RMF de celui du pentobarbital. Ainsi, le suivi du diamètre pupillaire est apparu comme un paramètre idéal. Il existe en effet, une bonne corrélation entre l'inhibition de la mydriase en réponse à un stimulus nocicepteur et les concentrations plasmatiques d'opioïdes<sup>60-62</sup>. Néanmoins, dans notre cas, la mesure du diamètre pupillaire chez le chien s'est avérée techniquement difficile à cause de la révulsion pupillaire observée selon la profondeur de l'anesthésie. Cet outil a finalement été abandonné au profit de l'électroencéphalographie.

### 2.3.2. Analyse spectrale de l'électroencéphalogramme

En choisissant l'électroencéphalographie pour mesurer la pharmacodynamie du RMF chez des chiens anesthésiés, nous redoutions de ne pas distinguer l'effet du RMF à travers la dépression de l'activité cérébrale causée par le pentobarbital. Comme tous les autres opioïdes, le RMF produit un changement caractéristique de l'activité cérébrale chez le chien<sup>56,324</sup> et l'Homme<sup>44,48,325</sup>, qui se traduit sur un tracé EEG par une diminution de la fréquence et une augmentation de l'amplitude des ondes cérébrales. Ainsi, l'activité dans la bande de fréquence delta (0-4 Hz) et le rebord spectral sont les deux paramètres les plus souvent décrits pour mesurer l'effet pharmacologique du RMF.

Dans notre étude, quatre électrodes ont été installées au niveau central et pariétal chez des chiens recevant périodiquement des bolus de pentobarbital. L'enregistrement de l'EEG a débuté 5 min avant l'administration de deux courtes perfusions de RMF et s'est



poursuivi 30 min après l'arrêt de la deuxième perfusion (exemple de tracés bruts en Annexe I). L'analyse spectrale a été effectuée en appliquant une fonction de transformé de Fourier sur des époques de 30 s pour obtenir des histogrammes décrivant la puissance de la densité spectrale en fonction de la fréquence. Quatre bandes de fréquence ont été définies 0,5-3,5 Hz (delta), 3,5-7,5 Hz (thêta), 7,5-13,5 Hz (alpha), 13,5-25 Hz (bêta). Les résultats de l'analyse ont démontré que 95% de la puissance spectrale était localisée dans la bande delta avant même l'administration du RMF, du fait que les chiens étaient sous anesthésie. Par conséquent, le rebord spectral ne constituait pas un bon paramètre pour mesurer l'activité cérébrale du médicament. L'analyse de la puissance absolue dans chaque bande de fréquence, révélait également que l'activité dans la bande delta était initialement importante à cause de l'anesthésie et, par conséquent, la contribution des faibles doses de RMF n'était pas décelable. Toutefois, la puissance absolue dans la bande de fréquence thêta variait significativement en fonction de la concentration du RMF dans le plasma, produisant une excellente corrélation avec le modèle pharmacodynamique de sigmoïde  $E_{\max}$  (cf. Annexe IV). De plus, les bolus de pentobarbital administrés de manière intermittente, n'influençaient pas la puissance dans la bande de fréquence thêta. Souvent la puissance absolue est soumise à diverses sources de variation (animal, électrodes, sensibilité de l'enregistrement) et on recommande de calculer la puissance relative dans une bande de fréquence donnée par rapport à la puissance totale. Dans notre étude, la puissance relative dans la bande de fréquence thêta fournissait une mauvaise corrélation avec le modèle de sigmoïde  $E_{\max}$ , du fait de sa faible contribution par rapport au spectre total. Bien que le paramètre de puissance absolue en thêta n'ait encore jamais été employé pour mesurer l'effet pharmacologique des opioïdes, il nous a permis de modéliser la pharmacodynamie du RMF alors que les chiens étaient anesthésiés au pentobarbital.

## 2.4. Modélisation pharmacocinétique

Les modèles pharmacocinétiques à un, deux et trois compartiments ont initialement été évalués dans les expériences préliminaires pour modéliser le profil pharmacocinétique du RMF suite à une forte dose de 4.4 mg/kg administrée sous forme de bolus chez le chien anesthésié au pentobarbital (cf. Annexe II). En se basant sur les critères d'Akaike (AIC), le coefficient de corrélation et les coefficients de variation associés à l'estimation des paramètres PK, le modèle à trois compartiments a été sélectionné. Dans les expériences subséquentes, on a administré deux courtes perfusions de RMF (1 puis 10  $\mu\text{g/kg/min}$ ), d'une durée chacune de 5min pour l'étude PK-PD et un bolus (50  $\mu\text{g/kg}$ ) suivi d'une perfusion de 60 minutes (40  $\mu\text{g/kg/min}$ ) pour l'étude à l'état d'équilibre. Dans ce cas, le modèle à deux compartiments était le plus approprié pour décrire l'évolution des concentrations plasmatiques du RMF chez le chien anesthésié (cf. Annexe III). En effet, étant donné que les doses administrées conduisaient à des concentrations plasmatiques inférieures, il n'a pas été possible de caractériser une troisième phase de décroissance et le logiciel ne convergeait pas avec un modèle à trois compartiments tenant compte des quatre doses administrées. La troisième partie de la courbe est observée uniquement lorsque la méthode analytique est suffisamment sensible ou si les concentrations plasmatiques sont initialement élevées. Il faut cependant préciser qu'elle représente moins de 5% de l'aire sous la courbe totale et n'est donc pas pertinente d'un point de vue clinique.

Pour la modélisation pharmacocinétique des concentrations plasmatiques du RMF en fonction du temps, une approche compartimentale a été privilégiée par rapport à un modèle de population à effets mixtes (« mixed-effect modeling ») étant donné le riche échantillonnage dont on disposait et le nombre total de chiens analysés. Dans une approche de population, les paramètres pharmacocinétiques sont décrits à partir de la minimisation des variabilités individuelles par rapport à la moyenne de population. Par conséquent, celles-ci sont généralement faibles, ce qui explique l'intérêt de cette approche pour traiter des données caractérisées par une variabilité globale provenant de temps de prélèvements

aléatoires, d'un nombre d'observation différent entre les sujets et d'un échantillonnage éparé.

### 3. Étude *in vivo*

#### 3.1. Protocole et résultats expérimentaux

Le protocole mis en place utilisait des chiens maintenus sous anesthésie par des bolus répétés de pentobarbital. Dans un premier temps, deux perfusions successives de RMF ont été administrées au cours desquelles nous avons suivi l'activité cérébrale pour l'analyse PK-PD. Après une période de «wash-out» d'environ 2 heures, le RMF a été perfusé pendant 60 minutes pour atteindre l'état d'équilibre. La comparaison statistique de trois prélèvements artériels et veineux successifs à 30, 40 et 50 min suivant le début de la perfusion a permis de confirmer l'état d'équilibre. L'étude sur la distribution du RMF impliquait d'échantillonner simultanément le liquide interstitiel musculaire par une méthode de microdialyse (deux périodes de 30 min) et le liquide céphalorachidien dans la cisterna magna. À la fin de la perfusion, des prélèvements artériels ont permis de compléter l'étude pharmacocinétique.

Les résultats expérimentaux ont mis en évidence l'extraction du RMF au niveau du muscle et du cerveau; ces deux tissus pouvant être associés respectivement aux compartiments périphérique et effet. L'extraction du RMF à travers le muscle gracilis a été calculée à partir des concentrations dans la veine et l'artère fémorale à l'équilibre. De manière similaire, l'extraction au niveau du cerveau a été mesurée entre la veine jugulaire et l'artère fémorale. Le pourcentage du RMF métabolisé à travers le muscle et le cerveau s'élève respectivement à 37 et 34%. Ces valeurs sont semblables à celles publiées par Chism et Rickert dans une étude portant sur la distribution tissulaire du RMF chez des chiens anesthésiés avec l'isoflurane<sup>70</sup>.



Les concentrations dans le liquide interstitiel musculaire (236 ng/mL) et le liquide céphalorachidien (319 ng/mL) à l'équilibre, représentaient respectivement 54 et 72% des concentrations artérielles et 77 et 113% des concentrations veineuses. Ces dernières permettaient une meilleure approximation des concentrations réelles mesurées en périphérie et dans la biophase.

### 3.2. Influence de l'extraction tissulaire sur les paramètres PK-PD du RMF

D'un point de vue pharmacodynamique, le RMF a démontré une installation et une durée d'action rapides, similaires à celles rapportées chez des chiens anesthésiés à l'isoflurane <sup>20</sup>. Basé sur les changements observés dans la bande de fréquence thêta, le temps d'équilibre moyen entre les concentrations plasmatiques et celles du compartiment effet ( $t_{1/2 k_{e0}}$ ) représentaient 1,4 min. Des valeurs semblables ont été obtenues en mesurant le rebord spectral chez des patients conscients <sup>44,326</sup> et chez des rats traités au préalable avec du midazolam (1,77 et 2,19 min) <sup>53</sup>. Chez des chiens anesthésiés à l'isoflurane, le demi-temps d'équilibre entre les compartiments central et effet était plus long lorsqu'on mesurait le rebord spectral, par rapport à l'activité dans la bande de fréquence delta <sup>20</sup>. Ces résultats suggèrent que le rebord spectral n'est probablement pas le meilleur indicateur de l'activité du RMF en présence d'une anesthésie.

La  $EC_{50}$  de chiens anesthésiés au pentobarbital était de 21 ng/mL. Des valeurs supérieures observées chez deux Beagles, pourraient être attribuées à une plus grande sensibilité de cette race vis-à-vis des opioïdes. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus chez le rat (26-32 ng mL<sup>-1</sup>) <sup>46</sup> ou l'Humain conscient (11-20 ng mL<sup>-1</sup>) <sup>44,53,326</sup>, mais diffèrent de ceux rapportés chez des chiens anesthésiés avec de l'isoflurane en analysant le rebord spectral ou l'activité delta (0,97 and 0,64 ng mL<sup>-1</sup>, respectivement) <sup>20</sup>. Toutefois, comme notre mesure pharmacodynamique repose sur l'activité dans la bande de fréquence thêta, toute comparaison avec d'autres études devient hasardeuse.



De manière générale, on a recourt à des prélèvements artériels lorsqu'on met en place un protocole pour une étude de PK-PD, car les concentrations artérielles libres représentent davantage celles délivrées au niveau des récepteurs pendant l'installation d'action. Qu'en est-il pour des médicaments éliminés justement au niveau de la biophase? Hermann et ses collaborateurs ont observé une hystérèse entre l'activité EEG et les concentrations veineuses du RMF tandis que le sens de l'hystérèse s'inverse lorsque l'analyse est basée sur des prélèvements artériels <sup>327</sup>. De telles données pourraient être faussement interprétées comme le développement d'un phénomène de tolérance mais proviennent plutôt du fait que les concentrations artérielles, s'équilibrent plus rapidement avec le site d'action que le compartiment veineux. On imagine aisément que ce phénomène est largement accentué par l'hydrolyse que subit le RMF au niveau de la biophase.

Pour dériver les concentrations dans le compartiment effet on assume, une fois l'équilibre de distribution atteint, que les concentrations libres dans les compartiments central (artériel) et effet sont égales. Comme l'échantillonnage a généralement lieu dans le compartiment sanguin, cette présupposition de base n'a jamais été vérifiée. Dans notre étude, nous avons comparé les concentrations dérivées dans le compartiment effet à celles mesurées dans le liquide céphalorachidien, que nous avons considéré être le reflet du liquide extracellulaire cérébral. Bien que le monitoring pharmacodynamique du RMF relevait de son action supraspinale (sédation), il aurait été difficile, d'un point de vue logistique de mesurer directement la concentration extracellulaire cérébrale libre par une technique de microdialyse. Produits indépendamment l'un de l'autre (barrière hématoencéphalique et plexus choroïde), les deux liquides sont néanmoins en communication étroite. De plus, le coefficient de partage du RMF est 17 fois supérieur à celui de la morphine; ce qui suggère que la vitesse de transfert à travers la barrière hématoencéphalique ou la barrière sang/liquide céphalorachidien *via* le plexus choroïde, n'est pas un facteur limitant. Nos résultats démontrent qu'à l'équilibre, lorsqu'un médicament est métabolisé dans la biophase, les concentrations libres dans le compartiment effet sont égales aux concentrations artérielles libres, à condition de tenir compte du





pourcentage d'extraction tissulaire et du coefficient de partage cellulaire. Dès lors, ce facteur de correction devrait être appliqué a posteriori à la  $EC_{50}$  lorsque celle-ci est estimée sur la base de prélèvements artériels. La comparaison de la puissance entre le RMF et les autres opioïdes serait alors permise. De plus, la similarité entre les concentrations prédites dans le compartiment effet (après correction) et celles mesurées dans le liquide céphalorachidien, suggère que ce dernier est l'un des constituants de la biophase. Ainsi, l'analyse compartimentale peut avoir une réalité physiologique et/ou anatomique même si cette vision demeure encore très controversée.

### **3.3. Influence de l'extraction musculaire sur les paramètres pharmacocinétiques du RMF**

D'un point de vue pharmacocinétique, l'administration du médicament et les prélèvements sanguins doivent s'effectuer au même endroit pour limiter tous les biais possibles. Or, l'administration intra-artérielle est inacceptable, vu les risques auxquels elle est associée. Par conséquent, l'interprétation des paramètres pharmacocinétiques obtenus à partir de prélèvements artériels suite à une administration *iv* devient compliquée, a fortiori lorsque le médicament est soumis à une extraction tissulaire. Dans notre étude, la clairance systémique déterminée à partir de prélèvements artériels (63 mL/min/kg) est comparable à celle rapportée chez 7 chiens anesthésiés avec l'isoflurane <sup>20</sup>. En revanche, la clairance systémique calculée chez des chiens anesthésiés avec un mélange de pentobarbital/barbital était 3 à 4 fois plus élevée que celle mesurée chez des chiens conscients (48 mL/min/kg) <sup>70</sup>, du fait d'un gradient artério-veineux supérieur au niveau de la veine fémorale par rapport à la veine saphène. Comme le RMF est hydrolysé à des vitesses variables dans les différents tissus il semblerait que le site d'installation de la canule veineuse soit extrêmement important pour une bonne estimation des paramètres pharmacocinétiques. Hermann et ses collaborateurs ont également étudié chez des femmes l'influence du site d'échantillonnage après une perfusion de RMF de 10 min <sup>326</sup>. Les concentrations artérielles et veineuses ont

été modélisées simultanément grâce à un modèle où le compartiment veineux est directement lié au compartiment central artériel. On a constaté alors, une surestimation de 40% de la clairance systémique mesurée à partir de prélèvements veineux.

La clairance métabolique associée au compartiment périphérique ( $Cl_{20}=k_{20}\times V_2$ ) est de 45 mL/min/kg ce qui représente 75% de la clairance systémique. Ces résultats illustrent l'importante extraction du RMF à travers les tissus comme le muscle et l'intestin, chez les chiens anesthésiés <sup>70</sup>.

La contribution du tissu musculaire à la clairance totale du RMF a été calculée en multipliant le débit sanguin de l'artère fémorale corrigé pour la fraction plasmatique, le pourcentage de muscle par kg de masse corporelle chez le chien (45,7%) <sup>328</sup> et le pourcentage d'extraction du RMF à travers le muscle (37%). La clairance métabolique moyenne du tissu musculaire représente alors 9,5% de la clairance systémique. En utilisant les valeurs du débit de l'artère fémorale avant l'administration du RMF, on obtient une contribution supérieure (15%). Ces valeurs sont du même ordre que celles publiées pour le mivacurium (16%), un médicament également soumis à une importante extraction musculaire <sup>306</sup>.

Le RMF est plus hydrophile que l'alfentanil (coefficient de partage octanol : eau , respectivement de 18 et 129) et sa fraction non ionisée dans le plasma est plus faible (67 vs 89%) d'où un volume de distribution plus petit. Toutefois, ce dernier est tellement faible qu'il ne peut expliquer la distribution intracellulaire du RMF. Cette constatation suggère qu'une analyse pharmacocinétique tenant compte de l'élimination périphérique devrait être envisagée afin de mieux estimer les paramètres pharmacocinétiques dépendants du site d'élimination. Il faut noter que ce type d'analyse n'a aucune incidence sur les paramètres PK-PD.

Dans un modèle pharmacocinétique mamillaire à deux compartiments, seulement trois microconstantes de transfert sont solvables. Lorsqu'on tient compte de l'élimination périphérique on introduit un quatrième paramètre, la microconstante  $k_{20}$ . Par conséquent, il est nécessaire de fixer la valeur de l'une ou l'autre microconstante pour rendre le modèle



identifiable. Dans le but de modéliser la pharmacocinétique de l'atracurium, Fisher et ses collaborateurs ont proposé d'attribuer à  $k_{20}$  la valeur de la constante d'hydrolyse mesurée *in vitro* dans le plasma <sup>299</sup>. Cependant, la présupposition selon laquelle  $k_{20}=k_{in vitro}$  n'est pas toujours vérifiée dans la mesure où l'activité enzymatique peut être différente *in vitro* et *in vivo*, sans compter qu'elle peut varier sensiblement entre le plasma et les autres tissus. Dans le cas du RMF, le temps de demi-vie d'hydrolyse mesuré *in vitro* dans le plasma ou même les homogénats de muscle, était plus lent que celui observé *in vivo* chez des chiens anesthésiés.

Nos résultats *in vivo* ont démontré qu'à l'équilibre, la concentration du métabolite augmentait à une vitesse constante dans l'artère et la veine fémorale, la veine jugulaire, le liquide interstitiel du muscle et le liquide céphalorachidien. La vitesse de formation du métabolite correspondant directement à la vitesse d'hydrolyse du RMF, cette observation confirme que l'équilibre d'élimination était atteint. La constante de formation du métabolite la plus rapide fut observée dans le liquide interstitiel. Cette dernière avoisinait la valeur de  $\beta$  calculée pour chacun des chiens. Or, lorsqu'on a préalablement démontré chez un même individu que  $k_{in vitro}=\beta$  (constante hybride d'élimination), on peut également assumer que  $k_{20}=\beta$ . Ainsi, nous avons assumé que  $k_{20}$  était égal à  $\beta$  pour tenir compte de l'élimination périphérique dans l'analyse pharmacocinétique du RMF. Cette présupposition est en accord avec le fait que le RMF est un substrat des estérases tissulaires et non plasmatiques<sup>65</sup>. Cette méthode est idéale dans la mesure où elle ne nécessite pas d'études *in vitro* supplémentaires, réduisant par le fait même la variabilité expérimentale.

Une analyse pharmacocinétique tenant compte de l'élimination périphérique a un impact important sur les microconstantes de transfert. La constante de vitesse de transfert à partir du compartiment central vers le compartiment périphérique  $k_{12}$  augmente, ce qui conduit à un volume de distribution à l'équilibre et un volume de distribution  $\beta$  supérieurs. Ainsi,  $V_2$  et  $Cl_{12}$  augmentent parallèlement à  $k_{12}$ . Par contre, la constante de vitesse de transfert du compartiment périphérique vers le compartiment central,  $k_{21}$ , est réduite proportionnellement à l'augmentation de  $V_2$ . Par conséquent, il en résulte que la  $Cl_{21}$  n'est



pas affectée en présence d'élimination périphérique. Dans un modèle pharmacocinétique à deux compartiments comprenant uniquement une élimination centrale, les clairances intercompartimentales sont égales. Cependant, lorsqu'on on ajoute la constante d'élimination périphérique,  $Cl_{12}$  devient supérieure à la  $Cl_{21}$ , traduisant l'augmentation de la quantité de médicament drainée par le compartiment périphérique. Pour le RMF, la  $Cl_{12}$  a augmenté de 6 fois ce qui démontre l'impact important de l'élimination périphérique sur les clairances de distribution.

Parmi les paramètres que l'on sous-estime lors d'une analyse pharmacocinétique traditionnelle, le volume de distribution à l'équilibre est celui qui a reçu la plus grande attention du fait de son importance clinique. Dans notre étude, en introduisant la constante  $k_{20}$ , le volume de distribution à l'équilibre augmente remarquablement et représente davantage la distribution intracellulaire du RMF (713 mL/kg). En effet, le modèle pharmacocinétique traditionnel aboutit à un  $V_{dss}$  de 228 mL/kg ce qui est à peine plus grand que le volume du compartiment extracellulaire. Lorsque le volume de distribution à l'équilibre est estimé sur la base de prélèvements veineux traités par un modèle avec élimination centrale exclusivement, il semble que sa valeur soit mieux estimée (867 mL/kg<sup>327</sup>, 737 mL/kg<sup>329</sup>). La similitude de ces valeurs avec notre propre résultat révèle que l'estimé choisi pour la constante  $k_{20}$  semble bien justifié.

Nos résultats confirment que la présupposition inhérente à l'approche compartimentale, selon laquelle à l'équilibre, les concentrations dans les compartiments central et périphérique sont égales, n'est plus valable pour des médicaments tels que le RMF. En effet, les valeurs des concentrations périphériques prédites sur la base de prélèvements artériels surestiment de deux fois les concentrations réelles mesurées dans le liquide interstitiel musculaire. En revanche, nous avons démontré que les concentrations dans le compartiment périphérique, peuvent être corrigées par le pourcentage d'extraction tissulaire et la fraction plasmatique libre pour prédire de manière exacte les concentrations réelles dans les tissus les moins perfusés.



Les concentrations de RMF dans le liquide interstitiel musculaire au cours de la première période de prélèvement (avant l'équilibre), sont légèrement supérieures aux concentrations veineuses et sont semblables aux concentrations simulées dans le compartiment périphérique puis corrigées. Ceci suggère un passage rapide des concentrations libres du RMF à travers les capillaires sanguins. Des résultats similaires ont été obtenus avec le rocuronium<sup>330</sup> et la gallamine<sup>204</sup> après un bolus. Pour ces molécules, les concentrations périphériques déclinent parallèlement aux concentrations artérielles comme si elles appartenaient à un même bassin pharmacocinétique. En revanche, à l'arrêt de la perfusion, les concentrations de RMF dans le liquide interstitiel musculaire sont dix fois supérieures aux concentrations artérielles mesurées. Elles se superposent aux concentrations dérivées dans le compartiment périphérique, après correction de ces dernières. Ces observations suggèrent que la redistribution du RMF dans l'espace vasculaire est compensé par l'efflux intracellulaire, ce qui n'est pas le cas pour des molécules hydrophiles.

L'hydrolyse tissulaire a d'autant plus d'impact pour des médicaments tels que les bloqueurs neuromusculaires dont le site d'action relève du compartiment périphérique. L'estimation de la  $EC_{50}$  pourrait être biaisée si les corrections appropriées ne sont pas apportées, notamment le pourcentage d'extraction tissulaire et la fraction libre.



#### 4. Conclusion générale

Ce travail a permis de lever le voile sur l'équilibre de distribution du RMF utilisé comme un modèle pour représenter les molécules soumises à une extraction tissulaire. Pour ce faire, une méthode analytique a été développée afin de doser simultanément le RMF et son métabolite dans le plasma. Ainsi, l'analyse PK-PD du RMF est plus robuste puisqu'on considère que seules les concentrations libres plasmatiques rejoignent la biophase. De plus, nous avons réussi à adapter les conditions de microdialyse pour le monitoring quantitatif du RMF. En effet, l'importante hydrolyse enzymatique de ce dernier dans le muscle représentait un réel défi pour la calibration des sondes *in vivo*. Enfin, nous avons démontré qu'en calculant la puissance dans la bande de fréquence  $\theta$ , paramètre encore peu utilisé pour l'analyse des tracés EEG bruts, nous avons réussi à distinguer l'effet du RMF de celui du pentobarbital. Bien que très fiables, chacune des méthodes mises au point pourrait être raffinée dans les expériences futures. Ainsi, on pourrait envisager une méthode analytique plus sensible qui utiliserait la spectrométrie de masse. De plus, en sélectionnant un calibrateur approprié il serait possible de développer une méthode de rétrodialyse combinée pour la calibration des sondes de microdialyse *in vivo*. Enfin, la mesure de l'EEG chez des chiens conscients ou anesthésiés à l'isoflurane devrait assurer des conditions anesthésiques plus stables et une analyse PK-PD plus robuste.

Les résultats de ces travaux confirment l'importance du site d'échantillonnage lorsqu'on détermine des paramètres tels que la  $EC_{50}$  ou la clairance pour des médicaments soumis à une extraction tissulaire dans la biophase et/ou dans le compartiment périphérique. Ils démontrent qu'à l'équilibre, les concentrations veineuses reflètent plus exactement les concentrations réelles mesurées dans le liquide céphalorachidien et le liquide interstitiel musculaire. Cependant, d'un point de vue pharmacodynamique, les concentrations artérielles décrivent mieux l'installation de l'effet d'un médicament. Par conséquent, nous préconisons d'appliquer un facteur de correction tenant compte de l'extraction tissulaire, de la fraction plasmatique libre et du coefficient de partage cellulaire afin d'estimer les « vraies » concentrations dans la biophase sur la base de prélèvements artériels. D'un point



208. Van Belle K, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Brain, liver and blood distribution kinetics of carbamazepine and its metabolic interaction with clomipramine in rats: a quantitative microdialysis study. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272:1217-22.
209. Stahle L, Guzenda E, Ljungdahl-Stahle E. Pharmacokinetics and extracellular distribution to blood, brain, and muscle of alovudine (3'-fluorothymidine) and zidovudine in the rat studied by microdialysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993;6:435-9.
210. Devineni D, Klein-Szanto A, Gallo JM. In vivo microdialysis to characterize drug transport in brain tumors: analysis of methotrexate uptake in rat glioma-2 (RG-2)-bearing rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;38:499-507.
211. Ekstrom O, Andersen A, Warren DJ, Giercksky KE, Slordal L. Evaluation of methotrexate tissue exposure by in situ microdialysis in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1994;34:297-301.
212. Dukic S, Kaltenbach ML, Gourdiier B, Marty H, Vistelle R. Determination of free extracellular levels of methotrexate by microdialysis in muscle and solid tumor of the rabbit. *Pharm Res*. 1998;15:133-8.
213. Verbeeck RK. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;45:217-28.
214. Maia MB, Saivin S, Chatelut E, Malmay MF, Houin G. In vitro and in vivo protein binding of methotrexate assessed by microdialysis. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1996;34:335-41.
215. Nakashima M, Takeuchi N, Hamada M, Matsuyama K, Ichikawa M, Goto S. In vivo microdialysis for pharmacokinetic investigations: a plasma protein binding study of valproate in rabbits. *Biol Pharm Bull*. 1994;17:1630-4.
216. Rabenstein K, McShane AJ, McKenna MJ, Dempsey E, Keaveny TV, Freaney R. An intravascular microdialysis sampling system suitable for application in continuous biochemical monitoring of glucose and lactate. *Technol Health Care*. 1996;4:67-76.
217. Joukhadar C, Derendorf H, Muller M. Microdialysis. A novel tool for clinical studies of anti-infective agents. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001;57:211-9.
218. Muller M, Haag O, Burgdorff T, Georgopoulos A, Weninger W, Jansen B, Stanek G, Pehamberger H, Agneter E, Eichler HG. Characterization of peripheral-compartment kinetics of antibiotics by in vivo microdialysis in humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2703-9.
219. Brunner M, Hollenstein U, Delacher S, Jager D, Schmid R, Lackner E, Georgopoulos A, Eichler HG, Muller M. Distribution and antimicrobial activity of ciprofloxacin in human soft tissues. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1307-9.
220. Frossard M, Joukhadar C, Erovic BM, Dittrich P, Mrass PE, Van Houte M, Burgmann H, Georgopoulos A, Muller M. Distribution and antimicrobial activity of fosfomycin in the interstitial fluid of human soft tissues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:2728-32.

221. Mindermann T, Zimmerli W, Gratzl O. Rifampin concentrations in various compartments of the human brain: a novel method for determining drug levels in the cerebral extracellular space. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:2626-9.
222. Muller M, Stass H, Brunner M, Moller JG, Lackner E, Eichler HG. Penetration of moxifloxacin into peripheral compartments in humans. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2345-9.
223. Tegeder I, Muth-Selbach U, Lotsch J, Rusing G, Oelkers R, Brune K, Meller S, Kelm GR, Sorgel F, Geisslinger G. Application of microdialysis for the determination of muscle and subcutaneous tissue concentrations after oral and topical ibuprofen administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65:357-68.
224. Muller M. Microdialysis in clinical drug delivery studies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;45:255-69.
225. Sartorelli P, Andersen HR, Angerer J, Corish J, Drexler H, Goen T, Griffin P, Hotchkiss SA, Larese F, Montomoli L, Perkins J, Schmelz M, van de Sandt J, Williams F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. 2000;8:133-152.
226. Jain RK, Gerlowski LE. Extravascular transport in normal and tumor tissues. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1986;5:115-70.
227. Muller M, Brunner M, Schmid R, Mader RM, Bockenheimer J, Steger GG, Steiner B, Eichler HG, Blochl-Daum B. Interstitial methotrexate kinetics in primary breast cancer lesions. *Cancer Res.* 1998;58:2982-5.
228. Mader RM, Brunner M, Rizovski B, Mensik C, Steger GG, Eichler HG, Muller M. Analysis of microdialysates from cancer patients by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 1998;19:2981-5.
229. Peerdeman SM, Girbes AR, Vandertop WP. Cerebral microdialysis as a new tool for neurometabolic monitoring. *Intensive Care Med.* 2000;26:662-9.
230. Patsalos PN, O'Connell MT, Doheny HC, Sander JW, Shorvon SD. Antiepileptic drug pharmacokinetics in patients with epilepsy using a new microdialysis probe: preliminary observations. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1996;67:59-62.
231. Hillered L, Persson L. Theory and practice of microdialysis--prospect for future clinical use. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1999;75:3-6.
232. Scheyer RD, During MJ, Hochholzer JM, Spencer DD, Cramer JA, Mattson RH. Phenytoin concentrations in the human brain: an in vivo microdialysis study. *Epilepsy Res.* 1994;18:227-32.
233. Delacher S, Derendorf H, Hollenstein U, Brunner M, Joukhadar C, Hofmann S, Georgopoulos A, Eichler HG, Muller M. A combined in vivo pharmacokinetic-in vitro pharmacodynamic approach to simulate target site pharmacodynamics of antibiotics in humans. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:733-9.
234. Muller M, Mader RM, Steiner B, Steger GG, Jansen B, Gnant M, Helbich T, Jakesz R, Eichler HG, Blochl-Daum B. 5-fluorouracil kinetics in the interstitial tumor space: clinical response in breast cancer patients. *Cancer Res.* 1997;57:2598-601.
235. Ronquist G, Hugosson R, Sjolander U, Ungerstedt U. Treatment of malignant glioma by a new therapeutic principle. *Acta Neurochir (Wien).* 1992;114:8-11.
236. Caton R. The electric currents of the brain. *Brit Med J.* 1875;2:278.





237. Delay J, Verdeaux G, Gaches J. Historique. In: Delay J. VGaGJ, ed. *Électroencéphalographie clinique*. Paris: Masson; 1978.
238. Holliday TA, Cunningham JG, Gutnick MJ. Comparative clinical and electroencephalographic studies of canine epilepsy. *Epilepsia*. 1970;11:281-92.
239. Fox MW, Stone AB. An electroencephalographic study of epilepsy in the dog. *J Small Anim Pract*. 1967;8:703-8.
240. Steiss JE, Cox NR, Knecht CD. Electroencephalographic and histopathologic correlations in eight dogs with intracranial mass lesions. *Am J Vet Res*. 1990;51:1286-91.
241. Mandema JW, Danhof M. Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1992;23:191-215.
242. Holliday TA, Williams C. Clinical electroencephalography in dogs. [www.neurovet.org](http://www.neurovet.org).
243. Buzsáki G, Traub RD, Pedley TA. The cellular basis of EEG activity. In: T.A. EJSaP, ed. *Current practice of clinical electroencephalography*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
244. Vieville T. Éléments de physiologie: quelques diapositives. [www-sop.inria.fr](http://www-sop.inria.fr).
245. Speckmann E-J, Elger CE. Introduction to the neurophysiological basis of the EEG and DC potentials. In: F. NEaLdS, ed. *Electrencephalography. Basic principles, clinical application and related fields*. Baltimore: Urban and Schwarzenberger; 1987.
246. Lewine JD, Orrison WW. Clinical electroencephalography and event related potentials. In: J.D. OWWaL, ed. *Functional brain imaging*. New York: Mosby; 1995.
247. Caspars H, Speckmann E-J, Lehmannkuehler A. Electrogenesis of slow potentials of the brain. In: Elbert T. RB, Luetzenberger W. and Birbaumer N., ed. *Regulation of the brain and behavior*. New York: Springer New York; 1984.
248. Nedergaard M. Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science*. 1994;263:1768-71.
249. Nedergaard M, Cooper AJ, Goldman SA. Gap junctions are required for the propagation of spreading depression. *J Neurobiol*. 1995;28:433-44.
250. Holmes O, Howard L. Mass and unitary activity in and around the primary somatosensory area in cats. *J Physiol*. 1971;217:45P-46P.
251. Andersen P, Bliss TV, Skrede KK. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res*. 1971;13:208-21.
252. Humphrey DR. Re-analysis of the antidromic cortical response. I. Potentials evoked by stimulation of the isolated pyramidal tract. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1968;24:116-29.
253. Humphrey DR. Re-analysis of the antidromic cortical response. II. On the contribution of cell discharge and PSPs to the evoked potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1968;25:421-42.



254. Cobb WA. Recommendations for the practice of clinical neurophysiology. In: W.A. C, ed. *International federation of societies for electroencephalography and clinical neurophysiology*. Amsterdam: Elsevier; 1983.
255. Reilly EL. EEG recording and operation of the apparatus. In: *Electroencephalography. Basic principles caarf*, ed. Niedermeyer E. and Lopes da Silva F. Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1987.
256. Gencer NG, Williamson SJ, Gueziec A, Hummel R. Optimal reference electrode selection for electric source imaging. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1996;99:163-73.
257. Litt B, Cranstoun D. Engineering principles. In: T.A. EJSaP, ed. *Current practice of clinical electroencephalography*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
258. Lopes da Silva F. EEG analysis: theory and practice. In: F. NEaLdS, ed. *Electroencephalography basic principles, clinical applications and related fields*. Baltimore: Urban and Schwarzenberg; 1987.
259. Dumermuth G, Molinari L. Spectral analysis of the EEG. Some fundamentals revisited and some open problems. *Neuropsychobiology*. 1987;17:85-99.
260. Kabbaj M, Vachon P, Varin F. Impact of the peripheral elimination on the concentration-effect relation of remifentanyl in anaesthetized dogs. *Br J Anaesth*. 2005;94:357-65.
261. Sigl JC, Chamoun NG. An introduction to bispectral analysis for the electroencephalogram. *J Clin Monit*. 1994;10:392-404.
262. Sebel PS, Lang E, Rampil IJ, White PF, Cork R, Jopling M, Smith NT, Glass PS, Manberg P. A multicenter study of bispectral electroencephalogram analysis for monitoring anesthetic effect. *Anesth Analg*. 1997;84:891-9.
263. Struys M, Versichelen L, Mortier E, Ryckaert D, De Mey JC, De Deyne C, Rolly G. Comparison of spontaneous frontal EMG, EEG power spectrum and bispectral index to monitor propofol drug effect and emergence. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1998;42:628-36.
264. Redding RW. In: R.W. R, ed. *Atlas of electroencephalography in the dog and cat*. New York: Praeger; 1984.
265. Redman HC, Wilson GL, Hogan JE. Effect of chlorpromazine combined with intermittent light stimulation on the electroencephalogram and clinical response of the Beagle dog. *Am J Vet Res*. 1973;34:929-36.
266. Klemm WR. Electroencephalography in the diagnosis of epilepsy. *Probl Vet Med*. 1989;1:535-57.
267. Joas TA, Stevens WC, Eger EI, 2nd. Electroencephalographic seizure activity in dogs during anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1971;43:739-45.
268. Foutz AS, Mitler MM, Dement WC. Narcolepsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1980;10:65-80.
269. da Silva FH, van Lierop TH, Schrijer CF, van Leeuwen WS. Organization of thalamic and cortical alpha rhythms: spectra and coherences. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1973;35:627-39.

270. Lopes da Silva FH, Leeuwen W. The cortical alpha rhythm in dog: the depth and surface profile of phase. In: H. BMABaP, ed. *Architetonics of the cerebral cortex*. New York: Raven Press; 1978.
271. Niedermeyer E. Sleep and EEG. In: F. NEaLdS, ed. *Electroencephalography. Basic principles, clinical applications and related fields*. Baltimore: Urban and Schwarzenbeck; 1987.
272. Wauquier A, Van den Broeck WAE, Niemgeers CJE, Janssen PAJ. Effects of morphine, fentanyl, sufentanil, and the short-acting morphine-like analgesic alfentanil on the EEG in dogs. *Drug Dev Res*. 1981;1:167-79.
273. Glass PS, Bloom M, Kears L, Rosow C, Sebel P, Manberg P. Bispectral analysis measures sedation and memory effects of propofol, midazolam, isoflurane, and alfentanil in healthy volunteers. *Anesthesiology*. 1997;86:836-47.
274. Rampil IJ. Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology*. 1994;80:606-10.
275. Rampil IJ, Mason P, Singh H. Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology*. 1993;78:707-12.
276. Kandel L, Chortkoff BS, Sonner J, Laster MJ, Eger EI, 2nd. Nonanesthetics can suppress learning. *Anesth Analg*. 1996;82:321-6.
277. Guignard B, Menigaux C, Dupont X, Fletcher D, Chauvin M. The effect of remifentanyl on the bispectral index change and hemodynamic responses after orotracheal intubation. *Anesth Analg*. 2000;90:161-7.
278. Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1978;6:547-58.
279. Cutler DJ. Theory of the mean absorption time, an adjunct to conventional bioavailability studies. *J Pharm Pharmacol*. 1978;30:476-8.
280. Benet LZ, Galeazzi RL. Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution. *J Pharm Sci*. 1979;68:1071-4.
281. Gillespie WR, Veng-Pedersen P. The determination of mean residence time using statistical moments: it is correct. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1985;13:549-54.
282. Veng-Pedersen P, Gillespie WR. Single pass mean residence time in peripheral tissues: a distribution parameter intrinsic to the tissue affinity of a drug. *J Pharm Sci*. 1986;75:1119-26.
283. LeBlanc PP, LeBel M. [Drug distribution in the body. II. Estimation of the concentration of drugs in small anatomic compartments]. *J Pharm Belg*. 1986;41:75-82.
284. LeBlanc PP, LeBel M. [Drug distribution in the body. I. Estimation of the kinetic rate and quantitation by statistical moments]. *J Pharm Belg*. 1986;41:69-74.
285. McNamara PJ, Fleishaker JC, Hayden TL. Mean residence time in peripheral tissue. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1987;15:439-50.
286. Rowland M, Benet LZ, Graham GG. Clearance concepts in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1973;1:123-36.



287. Holford NH, Sheiner LB. Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models. *Clin Pharmacokinet*. 1981;6:429-53.
288. Perrier D, Gibaldi M. General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. *J Pharm Sci*. 1982;71:474-5.
289. Wagner JG. Linear pharmacokinetic models and vanishing exponential terms: implications in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1976;4:395-425.
290. Gibaldi M, Perrier D. Multicompartment models. In: *Pharmacokinetics. Drug and pharmaceutical sciences*. New York: Marcel Dekker; 1982.
291. Collier PS. Some considerations on the estimation of steady state apparent volume of distribution and the relationships between volume terms. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1983;11:93-105.
292. Nakashima E, Benet LZ. General treatment of mean residence time, clearance, and volume parameters in linear mammillary models with elimination from any compartment. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1988;16:475-92.
293. Niazi S. Volume of distribution as a function of time. *J Pharm Sci*. 1976;65:452-4.
294. Gibaldi M, Levy G. Pharmacokinetics in clinical practice. I. Concepts. *Jama*. 1976;235:1864-7.
295. Gibaldi M, Levy G. Pharmacokinetics in clinical practice. 2. Applications. *Jama*. 1976;235:1987-92.
296. Colburn WA. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1981;9:367-88.
297. Fisher DM. (Almost) everything you learned about pharmacokinetics was (somewhat) wrong! *Anesth Analg*. 1996;83:901-3.
298. Ward S, Neill EA, Weatherley BC, Corall IM. Pharmacokinetics of atracurium besylate in healthy patients (after a single i.v. bolus dose). *Br J Anaesth*. 1983;55:113-8.
299. Fisher DM, Canfell PC, Fahey MR, Rosen JI, Rupp SM, Sheiner LB, Miller RD. Elimination of atracurium in humans: contribution of Hofmann elimination and ester hydrolysis versus organ-based elimination. *Anesthesiology*. 1986;65:6-12.
300. Lien CA, Schmith VD, Belmont MR, Abalos A, Kisor DF, Savarese JJ. Pharmacokinetics of cisatracurium in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. *Anesthesiology*. 1996;84:300-8.
301. Sorooshian SS, Stafford MA, Eastwood NB, Boyd AH, Hull CJ, Wright PM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium in young and elderly adult patients. *Anesthesiology*. 1996;84:1083-91.
302. Schmith VD, Fiedler-Kelly J, Phillips L, Grasela TH, Jr. Dose proportionality of cisatracurium. *J Clin Pharmacol*. 1997;37:625-9.
303. Tran TV, Fiset P, Varin F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cisatracurium after a short infusion in patients under propofol anesthesia. *Anesth Analg*. 1998;87:1158-63.



304. Jbilo O, Bartels CF, Chatonnet A, Toutant JP, Lockridge O. Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. *Toxicon*. 1994;32:1445-57.
305. Li B, Stribley JA, Ticu A, Xie W, Schopfer LM, Hammond P, Brimijoin S, Hinrichs SH, Lockridge O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *J Neurochem*. 2000;75:1320-31.
306. Ezzine S, Donati F, Varin F. Mivacurium arteriovenous gradient during steady state infusion in anesthetized patients. *Anesthesiology*. 2002;97:622-9.
307. Roy JJ, Donati F, Boismenu D, Varin F. Concentration-effect relation of succinylcholine chloride during propofol anesthesia. *Anesthesiology*. 2002;97:1082-92.
308. Bischoff KB, Dedrick RL. Thiopental pharmacokinetics. *J Pharm Sci*. 1968;57:1346-51.
309. Mather LE. Anatomical-physiological approaches in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40:707-22.
310. Beller GA, Smith TW, Abelmann WH, Haber E, Hood WB, Jr. Digitalis intoxication. A prospective clinical study with serum level correlations. *N Engl J Med*. 1971;284:989-97.
311. Mitenko PA, Ogilvie RI. Pharmacokinetics of intravenous theophylline. *Clin Pharmacol Ther*. 1973;14:509-13.
312. Kelman AW, Whiting B. Modeling of drug response in individual subjects. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1980;8:115-30.
313. Breckenridge A, Orme M, Wesseling H, Lewis RJ, Gibbons R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the enantiomers of warfarin in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1974;15:424-30.
314. Singh BN, Williams FM, Whitlock RM, Collett J, Chew C. Plasma timolol levels and systolic time intervals. *Clin Pharmacol Ther*. 1980;28:159-66.
315. Levy G. Kinetics of pharmacologic effects. *Clin Pharmacol Ther*. 1966;7:362-72.
316. Wagner JG, Aghajanian GK, Bing OH. Correlation of performance test scores with "tissue concentration" of lysergic acid diethylamide in human subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1968;9:635-8.
317. Reuning RH, Sams RA, Notari RE. Role of pharmacokinetics in drug dosage adjustment. I. Pharmacologic effect kinetics and apparent volume of distribution of digoxin. *J Clin Pharmacol New Drugs*. 1973;13:127-41.
318. Kramer WG, Kolibash AJ, Lewis RP, Bathala MS, Visconti JA, Reuning RH. Pharmacokinetics of digoxin: relationship between response intensity and predicted compartmental drug levels in man. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1979;7:47-61.
319. Tfelt-Hansen P, Paalzow L. Intramuscular ergotamine: plasma levels and dynamic activity. *Clin Pharmacol Ther*. 1985;37:29-35.
320. Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther*. 1979;25:358-71.



321. Fuseau E, Sheiner LB. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics with a nonparametric pharmacodynamic model. *Clin Pharmacol Ther.* 1984;35:733-41.
322. Unadkat JD, Bartha F, Sheiner LB. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics with nonparametric kinetic and dynamic models. *Clin Pharmacol Ther.* 1986;40:86-93.
323. Wang Y, Wong SL, Sawchuk RJ. Microdialysis calibration using retrodialysis and zero-net flux: application to a study of the distribution of zidovudine to rabbit cerebrospinal fluid and thalamus. *Pharm Res.* 1993;10:1411-9.
324. Wauquier A, De Ryck M, Van den Broeck W, Van Loon J, Melis W, Janssen P. Relationships between quantitative EEG measures and pharmacodynamics of alfentanil in dogs. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1988;69:550-60.
325. Wauquier A, Bovill JG, Sebel PS. Electroencephalographic effects of fentanyl-, sufentanil- and alfentanil anaesthesia in man. *Neuropsychobiology.* 1984;11:203-6.
326. Hermann DJ, Egan TD, Muir KT. Influence of arteriovenous sampling on remifentanil pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;65:511-8.
327. Hermann WM. *Development and critical evaluation of an objective procedure for the electroencephalographic classification of psychotropic drug.* Stuttgart; 1982.
328. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health.* 1997;13:407-84.
329. Pitsiu M, Wilmer A, Bodenham A, Breen D, Bach V, Bonde J, Kessler P, Albrecht S, Fisher G, Kirkham A. Pharmacokinetics of remifentanil and its major metabolite, remifentanil acid, in ICU patients with renal impairment. *Br J Anaesth.* 2004;92:493-503.
330. Ezzine S, Yamaguchi N, Varin F. Determination of interstitial rocuronium concentrations in the muscle tissue of anesthetized dogs by microdialysis. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2004;49:121-9.

de vue pharmacocinétique, les modèles tenant compte de l'élimination périphérique donnent en effet, un meilleur estimé du volume de distribution à l'équilibre qui reflète davantage la distribution intracellulaire du RMF. Cependant, leur principale faiblesse repose sur le fait que quelle que soit la valeur attribuée à  $k_{20}$ , les concentrations périphériques dérivées demeurent inchangées. Toutefois, en corrigeant ces dernières par l'extraction tissulaire et la fraction plasmatique libre, on est en mesure de prédire exactement les concentrations interstitielles musculaires. Ainsi, nous démontrons qu'il est possible de contourner le problème lié au site d'échantillonnage pour dériver les concentrations dans le compartiment effet lorsque le médicament est hydrolysé dans la biophase. De plus, nous remédions à la principale faiblesse inhérente à l'analyse compartimentale, en corrigeant les concentrations périphériques dérivées sur la base de prélèvements artériels, lorsqu'un médicament est soumis à une extraction tissulaire.

Bien que les modèles pharmacocinétiques artériels tenant compte de l'élimination périphérique demeurent les plus adéquats pour modéliser le devenir de médicaments tels que le RMF, il n'est pas toujours trivial d'attribuer une valeur à la constante d'élimination périphérique  $k_{20}$ . En somme, aucun modèle pharmacocinétique en particulier n'est tout à fait idéal pour modéliser le devenir de médicaments soumis à une élimination dans le compartiment périphérique. À la lumière de ce qu'on a décrit, il est primordial de connaître ses objectifs afin de faire un choix éclairé concernant le site d'échantillonnage et le type de modèle pharmacocinétique et éventuellement d'apporter les corrections nécessaires. Une approche de modélisation physiologique devrait probablement être envisagée pour éviter les limites intrinsèques à l'approche compartimentale dans le cas de médicaments soumis à une élimination indépendante des principaux organes de métabolisme.

Pour les anesthésiologistes l'introduction du RMF facilite le titrage de l'effet analgésique pendant l'intervention chirurgicale. Cependant, l'apparition d'une hyperalgésie post-opératoire reliée directement aux doses importantes ou prolongées d'opioïdes, démontre que la compréhension de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie des nouvelles molécules d'action ultracourte demeure plus que jamais essentielle pour un dosage optimal.



Dans cette optique, les résultats de nos travaux ouvrent des voies clef pour la recherche clinique. Par ailleurs, ils coïncident avec l'avènement des nouveaux systèmes informatisés reliés aux pompes d'infusion pour contrôler l'administration des médicaments et cibler les concentrations dans le compartiment effet. Il serait intéressant d'utiliser de tels systèmes pour valider la performance prédictive de notre approche. Dans ce cas, l'estimation des paramètres pharmacocinétiques du RMF pourrait provenir d'une approche de population à effets mixtes qui utilise des équations compartimentales avec élimination périphérique en vue de tester des valeurs de population minimales et maximales tout en individualisant le dosage complexe du RMF.





## BIBLIOGRAPHIE

1. Laurin J, Nekka F, Donati F, Varin F. Assuming peripheral elimination: its impact on the estimation of pharmacokinetic parameters of muscle relaxants. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1999;27:491-512.
2. Smith RR. Scopolamine-morphine anesthesia, with report of two hundred and twenty-nine cases. *Surg Gynecol Obstet.* 1908;7:414.
3. Sexton JC. Death following scopolamine-morphine injection. *Lancet Clin.* 1905;55:582.
4. Lundy JS. Balanced anesthesia. *Minn Med.* 1926;9:399.
5. Stoelting RK, Gibbs PS, Creasser CW, Peterson C. Hemodynamic and ventilatory responses to fentanyl, fentanyl-droperidol, and nitrous oxide in patients with acquired valvular heart disease. *Anesthesiology.* 1975;42:319-24.
6. Bennett GM, Stanley TH. Cardiovascular effects of fentanyl during enflurane anesthesia in man. *Anesth Analg.* 1979;58:179-82.
7. Stanley TH, Philbin DM, Coggins CH. Fentanyl-oxygen anaesthesia for coronary artery surgery: cardiovascular and antidiuretic hormone responses. *Can Anaesth Soc J.* 1979;26:168-72.
8. Lemmens HJ. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for opioids in balanced anaesthesia. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29:231-42.
9. Istvan N. Sensory processing: primary afferent neuron/dorsal root ganglia. In: Evers AS, Maze M, eds. *Anesthetic pharmacology. Physiologic principles and clinical practice.* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
10. Garnier M-C, Ternaux M. La douleur. In: [www.inrp.fr/acces/biotic/neuro/douleur/accueil.htm](http://www.inrp.fr/acces/biotic/neuro/douleur/accueil.htm).
11. Fiset P, Bushnell M.C. Neural substrates for behavior: pain. In: Evers AS, Maze M, eds. *Anesthetic pharmacology. Physiologic principles and clinical practice.* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
12. <http://www.images.md/>.
13. James MK, Feldman PL, Schuster SV, Bilotta JM, Brackeen MF, Leighton HJ. Opioid receptor activity of GI 87084B, a novel ultra-short acting analgesic, in isolated tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;259:712-8.
14. Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:565-75.
15. Chang HM, Berde CB, Holz GG, Steward GF, Kream RM. Sufentanil, morphine, met-enkephalin, and kappa-agonist (U-50,488H) inhibit substance P release from primary sensory neurons: a model for presynaptic spinal opioid actions. *Anesthesiology.* 1989;70:672-7.
16. Stein C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth Analg.* 1992;76:182.
17. Stein C, Rosow CE. Analgesics: receptor ligands and opiate narcotics. In: Evers AS, Maze M, eds. *Anesthetic pharmacology. Physiologic principles and clinical practice.* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
18. Selinger K, Lanzo C, Sekut A. Determination of remifentanyl in human and dog blood by HPLC with UV detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1994;12:243-8.



19. Grosse CM, Davis IM, Arrendale RF, Jersey J, Amin J. Determination of remifentanil in human blood by liquid-liquid extraction and capillary GC-HRMS-SIM using a deuterated internal standard. *J Pharm Biomed Anal.* 1994;12:195-203.
20. Hoke JF, Cunningham F, James MK, Muir KT, Hoffman WE. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanil, its principle metabolite (GR90291) and alfentanil in dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281:226-32.
21. Lessard D, Comeau B, Charlebois A, Letarte L, Davis IM. Quantification of GR90291 in human blood by high resolution gas chromatography-mass selective detection (HRGC-MSD). *J Pharm Biomed Anal.* 1994;12:659-65.
22. Haidar SH, Liang Z, Selinger K, Hamlett L, Eddington ND. Determination of remifentanil, an ultra-short-acting opioid anesthetic, in rat blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14:1727-32.
23. Bender J, van den Elshout J, Selinger K, Broeders G, Dankers J, van der Heiden C. Determination of remifentanil in human heparinised whole blood by tandem mass spectrometry with short-column separation. *J Pharm Biomed Anal.* 1999;21:559-67.
24. Kabbaj M, Varin F. Simultaneous solid-phase extraction with liquid chromatography with ultraviolet absorbance for the determination of remifentanil and its metabolite in dog plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2003;783:103-9.
25. Eaton M. Common animal models for spasticity and pain. *J Rehabil Res Dev.* 2003;40:41-54.
26. Ginosar Y, Riley ET, Angst MS. The site of action of epidural fentanyl in humans: the difference between infusion and bolus administration. *Anesth Analg.* 2003;97:1428-38.
27. Altier N, Stewart J. The role of dopamine in the nucleus accumbens in analgesia. *Life Sci.* 1999;65:2269-87.
28. Lotsch J, Angst MS. The mu-opioid agonist remifentanil attenuates hyperalgesia evoked by blunt and punctuated stimuli with different potency: a pharmacological evaluation of the freeze lesion in humans. *Pain.* 2003;102:151-61.
29. Angst MS, Koppert W, Pahl I, Clark DJ, Schmelz M. Short-term infusion of the mu-opioid agonist remifentanil in humans causes hyperalgesia during withdrawal. *Pain.* 2003;106:49-57.
30. Jhaveri R, Joshi P, Batenhorst R, Baughman V, Glass PS. Dose comparison of remifentanil and alfentanil for loss of consciousness. *Anesthesiology.* 1997;87:253-9.
31. Dershwitz M, Randel GI, Rosow CE, Fragen RJ, Connors PM, Librojo ES, Shaw DL, Peng AW, Jamerson BD. Initial clinical experience with remifentanil, a new opioid metabolized by esterases. *Anesth Analg.* 1995;81:619-23.
32. Lang E, Kapila A, Shlugman D, Hoke JF, Sebel PS, Glass PS. Reduction of isoflurane minimal alveolar concentration by remifentanil. *Anesthesiology.* 1996;85:721-8.



33. Glass PS, Hardman D, Kamiyama Y, Quill TJ, Marton G, Donn KH, Grosse CM, Hermann D. Preliminary pharmacokinetics and pharmacodynamics of an ultra-short-acting opioid: remifentanyl (GI87084B). *Anesth Analg*. 1993;77:1031-40.
34. Amin HM, Sopchak AM, Esposito BF, Henson LG, Batenhorst RL, Fox AW, Camporesi EM. Naloxone-induced and spontaneous reversal of depressed ventilatory responses to hypoxia during and after continuous infusion of remifentanyl or alfentanil. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274:34-9.
35. Kapila A, Glass PS, Jacobs JR, Muir KT, Hermann DJ, Shiraishi M, Howell S, Smith RL. Measured context-sensitive half-times of remifentanyl and alfentanil. *Anesthesiology*. 1995;83:968-75.
36. Eger EI, 2nd, Saidman LJ, Brandstater B. Minimum alveolar anesthetic concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology*. 1965;26:756-63.
37. Westmoreland CL, Sebel PS, Gropper A. Fentanyl or alfentanil decreases the minimum alveolar anesthetic concentration of isoflurane in surgical patients. *Anesth Analg*. 1994;78:23-8.
38. Brunner MD, Braithwaite P, Jhaveri R, McEwan AI, Goodman DK, Smith LR, Glass PS. MAC reduction of isoflurane by sufentanil. *Br J Anaesth*. 1994;72:42-6.
39. McEwan AI, Smith C, Dyar O, Goodman D, Smith LR, Glass PS. Isoflurane minimum alveolar concentration reduction by fentanyl. *Anesthesiology*. 1993;78:864-9.
40. Michelsen LG, Salmenpera M, Hug CC, Jr., Szlam F, VanderMeer D. Anesthetic potency of remifentanyl in dogs. *Anesthesiology*. 1996;84:865-72.
41. Bovill JG, Sebel PS, Blackburn CL, Oei-Lim V, Heykants JJ. The pharmacokinetics of sufentanil in surgical patients. *Anesthesiology*. 1984;61:502-6.
42. Lemmens HJ, Dyck JB, Shafer SL, Stanski DR. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling in drug development: application to the investigational opioid trefentanyl. *Clin Pharmacol Ther*. 1994;56:261-71.
43. Bower S, Hull CJ. Comparative pharmacokinetics of fentanyl and alfentanil. *Br J Anaesth*. 1982;54:871-7.
44. Egan TD, Minto CF, Hermann DJ, Barr J, Muir KT, Shafer SL. Remifentanyl versus alfentanil: comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology*. 1996;84:821-33.
45. Scott JC, Cooke JE, Stanski DR. Electroencephalographic quantitation of opioid effect: comparative pharmacodynamics of fentanyl and sufentanil. *Anesthesiology*. 1991;74:34-42.
46. Haidar SH, Moreton JE, Liang Z, Hoke JF, Muir KT, Eddington ND. The pharmacokinetics and electroencephalogram response of remifentanyl alone and in combination with esmolol in the rat. *Pharm Res*. 1997;14:1817-23.
47. Scott JC, Stanski DR. Decreased fentanyl and alfentanil dose requirements with age. A simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;240:159-66.

48. Scott JC, Ponganis KV, Stanski DR. EEG quantitation of narcotic effect: the comparative pharmacodynamics of fentanyl and alfentanil. *Anesthesiology*. 1985;62:234-41.
49. James MK, Vuong A, Grizzle MK, Schuster SV, Shaffer JE. Hemodynamic effects of GI 87084B, an ultra-short acting mu-opioid analgesic, in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263:84-91.
50. Sebel PS, Hoke JF, Westmoreland C, Hug CC, Jr., Muir KT, Szlam F. Histamine concentrations and hemodynamic responses after remifentanyl. *Anesth Analg*. 1995;80:990-3.
51. Hanouz JL, Yvon A, Guesne G, Eustratiades C, Babatasi G, Rouet R, Ducouret P, Khayat A, Bricard H, Gerard JL. The in vitro effects of remifentanyl, sufentanyl, fentanyl, and alfentanil on isolated human right atria. *Anesth Analg*. 2001;93:543-9.
52. Unlugenc H, Itegin M, Ocal I, Ozalevli M, Guler T, Isik G. Remifentanyl produces vasorelaxation in isolated rat thoracic aorta strips. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003;47:65-9.
53. Minto CF, Schnider TW, Egan TD, Youngs E, Lemmens HJ, Gambus PL, Billard V, Hoke JF, Moore KH, Hermann DJ, Muir KT, Mandema JW, Shafer SL. Influence of age and gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl. I. Model development. *Anesthesiology*. 1997;86:10-23.
54. Hoke JF, Shlugman D, Dershwitz M, Michalowski P, Malthouse-Dufore S, Connors PM, Martel D, Rosow CE, Muir KT, Rubin N, Glass PS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in persons with renal failure compared with healthy volunteers. *Anesthesiology*. 1997;87:533-41.
55. Dershwitz M, Hoke JF, Rosow CE, Michalowski P, Connors PM, Muir KT, Dienstag JL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of remifentanyl in volunteer subjects with severe liver disease. *Anesthesiology*. 1996;84:812-20.
56. Hoffman WE, Cunningham F, James MK, Baughman VL, Albrecht RF. Effects of remifentanyl, a new short-acting opioid, on cerebral blood flow, brain electrical activity, and intracranial pressure in dogs anesthetized with isoflurane and nitrous oxide. *Anesthesiology*. 1993;79:107-13; discussion 26A.
57. Warner DS, Hindman BJ, Todd MM, Sawin PD, Kirchner J, Roland CL, Jamerson BD. Intracranial pressure and hemodynamic effects of remifentanyl versus alfentanil in patients undergoing supratentorial craniotomy. *Anesth Analg*. 1996;83:348-53.
58. Guy J, Hindman BJ, Baker KZ, Borel CO, Maktabi M, Ostapovich N, Kirchner J, Todd MM, Fogarty-Mack P, Yancy V, Sokoll MD, McAllister A, Roland C, Young WL, Warner DS. Comparison of remifentanyl and fentanyl in patients undergoing craniotomy for supratentorial space-occupying lesions. *Anesthesiology*. 1997;86:514-24.
59. Mayberg TS, Lam AM, Eng CC, Laohaprasit V, Winn HR. The effect of alfentanil on cerebral blood flow velocity and intracranial pressure during isoflurane-nitrous oxide anesthesia in humans. *Anesthesiology*. 1993;78:288-94.

60. Larson MD, Kurz A, Sessler DI, Dechert M, Bjorksten AR, Tayefeh F. Alfentanil blocks reflex pupillary dilation in response to noxious stimulation but does not diminish the light reflex. *Anesthesiology*. 1997;87:849-55.
61. Larson MD, Sessler DI, Washington DE, Merrifield BR, Hynson JA, McGuire J. Pupillary response to noxious stimulation during isoflurane and propofol anesthesia. *Anesth Analg*. 1993;76:1072-8.
62. Barvais L, Engelman E, Eba JM, Coussaert E, Cantraine F, Kenny GN. Effect site concentrations of remifentanil and pupil response to noxious stimulation. *Br J Anaesth*. 2003;91:347-52.
63. Egan TD, Lemmens HJ, Fiset P, Hermann DJ, Muir KT, Stanski DR, Shafer SL. The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanil (GI87084B) in healthy adult male volunteers. *Anesthesiology*. 1993;79:881-92.
64. Westmoreland CL, Hoke JF, Sebel PS, Hug CC, Jr., Muir KT. Pharmacokinetics of remifentanil (GI87084B) and its major metabolite (GI90291) in patients undergoing elective inpatient surgery. *Anesthesiology*. 1993;79:893-903.
65. Davis PJ, Stiller RL, Wilson AS, McGowan FX, Egan TD, Muir KT. In vitro remifentanil metabolism: the effects of whole blood constituents and plasma butyrylcholinesterase. *Anesth Analg*. 2002;95:1305-7.
66. Manullang J, Egan TD. Remifentanil's effect is not prolonged in a patient with pseudocholinesterase deficiency. *Anesth Analg*. 1999;89:529-30.
67. Egan TD. Remifentanil pharmacokinetics and pharmacodynamics. A preliminary appraisal. *Clin Pharmacokinet*. 1995;29:80-94.
68. Royston D. Remifentanil in cardiac surgery. *Eur J Anaesthesiol Suppl*. 1995;10:77-9.
69. Michelsen LG, Holford NH, Lu W, Hoke JF, Hug CC, Bailey JM. The pharmacokinetics of remifentanil in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 2001;93:1100-5.
70. Chism JP, Rickert DE. The pharmacokinetics and extra-hepatic clearance of remifentanil, a short acting opioid agonist, in male beagle dogs during constant rate infusions. *Drug Metab Dispos*. 1996;24:34-40.
71. Egan TD, Huizinga B, Gupta SK, Jaarsma RL, Sperry RJ, Yee JB, Muir KT. Remifentanil pharmacokinetics in obese versus lean patients. *Anesthesiology*. 1998;89:562-73.
72. Ross AK, Davis PJ, Dear Gd GL, Ginsberg B, McGowan FX, Stiller RD, Henson LG, Huffman C, Muir KT. Pharmacokinetics of remifentanil in anesthetized pediatric patients undergoing elective surgery or diagnostic procedures. *Anesth Analg*. 2001;93:1393-401, table of contents.
73. Inc G.
74. Kovac AL, Azad SS, Steer P, Witkowski T, Batenhorst R, McNeal S. Remifentanil versus alfentanil in a balanced anesthetic technique for total abdominal hysterectomy. *J Clin Anesth*. 1997;9:532-41.

75. Bowdle TA, Camporesi EM, Maysick L, Hogue CW, Jr., Miguel RV, Pitts M, Streisand JB. A multicenter evaluation of remifentanyl for early postoperative analgesia. *Anesth Analg*. 1996;83:1292-7.
76. Philip BK, Scuderi PE, Chung F, Conahan TJ, Maurer W, Angel JJ, Kallar SK, Skinner EP, Jamerson BD. Remifentanyl compared with alfentanil for ambulatory surgery using total intravenous anesthesia. The Remifentanyl/Alfentanil Outpatient TIVA Group. *Anesth Analg*. 1997;84:515-21.
77. Sneyd JR, Camu F, Doenicke A, Mann C, Holgersen O, Helmers JH, Appelgren L, Noronha D, Upadhyaya BK. Remifentanyl and fentanyl during anaesthesia for major abdominal and gynaecological surgery. An open, comparative study of safety and efficacy. *Eur J Anaesthesiol*. 2001;18:605-14.
78. Alper I, Erhan E, Ugur G, Ozyar B. Remifentanyl versus alfentanil in total intravenous anaesthesia for day case surgery. *Eur J Anaesthesiol*. 2003;20:61-4.
79. Peacock JE, Luntley JB, O'Connor B, Reilly CS, Ogg TW, Watson BJ, Shaikh S. Remifentanyl in combination with propofol for spontaneous ventilation anaesthesia. *Br J Anaesth*. 1998;80:509-11.
80. Servin F, Desmonts JM, Watkins WD. Remifentanyl as an analgesic adjunct in local/regional anesthesia and in monitored anesthesia care. *Anesth Analg*. 1999;89:S28-32.
81. Mingus ML, Monk TG, Gold MI, Jenkins W, Roland C. Remifentanyl versus propofol as adjuncts to regional anesthesia. Remifentanyl 3010 Study Group. *J Clin Anesth*. 1998;10:46-53.
82. Smith I, Avramov MN, White PF. A comparison of propofol and remifentanyl during monitored anesthesia care. *J Clin Anesth*. 1997;9:148-54.
83. Avramov MN, Smith I, White PF. Interactions between midazolam and remifentanyl during monitored anesthesia care. *Anesthesiology*. 1996;85:1283-9.
84. Gold MI, Watkins WD, Sung YF, Yarmush J, Chung F, Uy NT, Maurer W, Clarke MY, Jamerson BD. Remifentanyl versus remifentanyl/midazolam for ambulatory surgery during monitored anesthesia care. *Anesthesiology*. 1997;87:51-7.
85. Albrecht S, Schuttler J, Yarmush J. Postoperative pain management after intraoperative remifentanyl. *Anesth Analg*. 1999;89:S40-5.
86. Yarmush J, D'Angelo R, Kirkhart B, O'Leary C, Pitts MC, 2nd, Graf G, Sebel P, Watkins WD, Miguel R, Streisand J, Maysick LK, Vujic D. A comparison of remifentanyl and morphine sulfate for acute postoperative analgesia after total intravenous anesthesia with remifentanyl and propofol. *Anesthesiology*. 1997;87:235-43.
87. Schuttler J, Albrecht S, Breivik H, Osnes S, Prys-Roberts C, Holder K, Chauvin M, Viby-Mogensen J, Mogensen T, Gustafson I, Lof L, Noronha D, Kirkham AJ. A comparison of remifentanyl and alfentanil in patients undergoing major abdominal surgery. *Anaesthesia*. 1997;52:307-17.
88. Mackey JJ, Parker SD, Nass CM, Snyder DS, Curreri S, Kazim D, Zuckerman RL, Fleisher LA. Effectiveness of remifentanyl versus traditional fentanyl-based anesthetic in high-risk outpatient surgery. *J Clin Anesth*. 2000;12:427-32.



89. Guignard B, Bossard AE, Coste C, Sessler DI, Lebrault C, Alfonsi P, Fletcher D, Chauvin M. Acute opioid tolerance: intraoperative remifentanyl increases postoperative pain and morphine requirement. *Anesthesiology*. 2000;93:409-17.
90. Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem*. 1989;52:1667-79.
91. Elmquist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res*. 1997;14:267-88.
92. de Lange EC, de Boer AG, Breimer DD. Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;45:125-48.
93. Johansen MJ, Newman RA, Madden T. The use of microdialysis in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacotherapy*. 1997;17:464-81.
94. Hansen DK, Davies MI, Lunte SM, Lunte CE. Pharmacokinetic and metabolism studies using microdialysis sampling. *J Pharm Sci*. 1999;88:14-27.
95. Davies MI, Cooper JD, Desmond SS, Lunte CE, Lunte SM. Analytical considerations for microdialysis sampling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;45:169-88.
96. Scott DO, Lunte CE. In vivo microdialysis sampling in the bile, blood, and liver of rats to study the disposition of phenol. *Pharm Res*. 1993;10:335-42.
97. Hadwiger ME, Telting-Diaz M, Lunte CE. Liquid chromatographic determination of tacrine and its metabolites in rat bile microdialysates. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1994;655:235-41.
98. Dempsey E, Diamond D, Smyth MR, Malone MA, Rabenstein K, McShane A, McKenna M, Keaveny TV, Freaney R. In vitro optimisation of a microdialysis system with potential for on-line monitoring of lactate and glucose in biological samples. *Analyst*. 1997;122:185-9.
99. Hernandez L, Stanley BG, Hoebel BG. A small, removable microdialysis probe. *Life Sci*. 1986;39:2629-37.
100. Nakamura M, Itano T, Yamaguchi F, Mizobuchi M, Tokuda M, Matsui H, Etoh S, Hosokawa K, Ohmoto T, Hatase O. In vivo analysis of extracellular proteins in rat brains with a newly developed intracerebral microdialysis probe. *Acta Med Okayama*. 1990;44:1-8.
101. Marsala M, Malmberg AB, Yaksh TL. The spinal loop dialysis catheter: characterization of use in the unanesthetized rat. *J Neurosci Methods*. 1995;62:43-53.
102. Evrard PA, Deridder G, Verbeeck RK. Intravenous microdialysis in the mouse and the rat: development and pharmacokinetic application of a new probe. *Pharm Res*. 1996;13:12-7.
103. Hsiao JK, Ball BA, Morrison PF, Mefford IN, Bungay PM. Effects of different semipermeable membranes on in vitro and in vivo performance of microdialysis probes. *J Neurochem*. 1990;54:1449-52.
104. Tao R, Hjorth S. Differences in the in vitro and in vivo 5-hydroxytryptamine extraction performance among three common microdialysis membranes. *J Neurochem*. 1992;59:1778-85.
105. Kuipers RA, Korf J. Flow resistance characteristics of microdialysis probes in vitro. *Med Biol Eng Comput*. 1994;32:103-7.



106. Benveniste H, Huttenlocher PC. Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol.* 1990;35:195-215.
107. Moghaddam B, Bunney BS. Ionic composition of microdialysis perfusing solution alters the pharmacological responsiveness and basal outflow of striatal dopamine. *J Neurochem.* 1989;53:652-4.
108. Osborne PG, O'Connor WT, Drew KL, Ungerstedt U. An in vivo microdialysis characterization of extracellular dopamine and GABA in dorsolateral striatum of awake freely moving and halothane anaesthetised rats. *J Neurosci Methods.* 1990;34:99-105.
109. Timmerman W, Westerink BH. Importance of the calcium content infused during microdialysis for the effects induced by D2 agonists on the release of dopamine in the striatum of the rat. *Neurosci Lett.* 1991;131:93-6.
110. de Lange EC, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. Critical factors of intracerebral microdialysis as a technique to determine the pharmacokinetics of drugs in rat brain. *Brain Res.* 1994;666:1-8.
111. Levine JE, Powell KD. Microdialysis for measurement of neuroendocrine peptides. *Methods Enzymol.* 1989;168:166-81.
112. Maidment NT, Brumbaugh DR, Rudolph VD, Erdelyi E, Evans CJ. Microdialysis of extracellular endogenous opioid peptides from rat brain in vivo. *Neuroscience.* 1989;33:549-57.
113. Wong SL, Van Belle K, Sawchuk RJ. Distributional transport kinetics of zidovudine between plasma and brain extracellular fluid/cerebrospinal fluid in the rabbit: investigation of the inhibitory effect of probenecid utilizing microdialysis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993;264:899-909.
114. Scott DO, Sorensen LR, Lunte CE. In vivo microdialysis sampling coupled to liquid chromatography for the study of acetaminophen metabolism. *J Chromatogr.* 1990;506:461-9.
115. Malhotra BK, Lemaire M, Sawchuk RJ. Investigation of the distribution of EAB 515 to cortical ECF and CSF in freely moving rats utilizing microdialysis. *Pharm Res.* 1994;11:1223-32.
116. Marsden CA, Macdonald IA, Joseph MH, Perrett D. Electrochemical detection, HPLC and in vivo monitoring in the biosciences. *J Neurosci Methods.* 1990;34:1-2.
117. Ruban VF. Determination of dopamine and its metabolites in microdialysates by capillary liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr.* 1993;619:111-5.
118. Cheng FC, Kuo JS. High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995;665:1-13.
119. Caprioli RM, Lin SN. On-line analysis of penicillin blood levels in the live rat by combined microdialysis/fast-atom bombardment mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:240-3.
120. Menacherry SD, Justice JB, Jr. In vivo microdialysis and thermospray tandem mass spectrometry of the dopamine uptake blocker 1-[2-bis(4-





- fluorophenyl)methoxy]ethyl]-4-(3-phenylpropyl)-piperazine (GBR-12909). *Anal Chem.* 1990;62:597-601.
121. Michelsen P, Pettersson G. An automated liquid chromatography/mass spectrometry system coupled on-line with microdialysis for the in vivo analysis of contrast agents. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1994;8:517-20.
  122. Kobayashi N, Kazui M, Ikeda T. Rapid, real-time sampling of R-84760 in blood by in vivo microdialysis with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21:1233-42.
  123. Miller MA, Geary RS. RIA-linked microdialysis sampling in the awake rat: application to free-drug pharmacokinetics of hydrocortisone. *J Pharm Biomed Anal.* 1991;9:901-10.
  124. Lindefors N, Brodin E, Ungerstedt U. Microdialysis combined with a sensitive radioimmunoassay. A technique for studying in vivo release of neuropeptides. *J Pharmacol Methods.* 1987;17:305-12.
  125. Mackie CE, English HE, Lelievre E, Gordon BH, Genissel P, Robinson BV. Radioimmunoassay for the measurement of S9788 in serum and microdialysis samples. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15:917-28.
  126. Palsmeier RK, Lunte CE. Microdialysis sampling in tumor and muscle: study of the disposition of 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-di-N-oxide (SR 4233). *Life Sci.* 1994;55:815-25.
  127. Steele KM, Lunte CE. Microdialysis sampling coupled to on-line microbore liquid chromatography for pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 1995;13:149-54.
  128. Tellez S, Forges N, Roussin A, Hernandez L. Coupling of microdialysis with capillary electrophoresis: a new approach to the study of drug transfer between two compartments of the body in freely moving rats. *J Chromatogr.* 1992;581:257-66.
  129. Lunte SM, O'Shea TJ. Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis/electrochemistry. *Electrophoresis.* 1994;15:79-86.
  130. Mock K, Hail M, Mylchreest I, Zhou J, Johnson K, Jardine I. Rapid high-sensitivity peptide mapping by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1993;646:169-74.
  131. Robert F, Bert L, Denoroy L, Renaud B. Capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for the determination of nanomolar concentrations of noradrenaline and dopamine: application to brain microdialysate analysis. *Anal Chem.* 1995;67:1838-44.
  132. Zhou SY, Zuo H, Stobaugh JF, Lunte CE, Lunte SM. Continuous in vivo monitoring of amino acid neurotransmitters by microdialysis sampling with on-line derivatization and capillary electrophoresis separation. *Anal Chem.* 1995;67:594-9.
  133. Boyd BW, Witowski SR, Kennedy RT. Trace-level amino acid analysis by capillary liquid chromatography and application to in vivo microdialysis sampling with 10-s temporal resolution. *Anal Chem.* 2000;72:865-71.
  134. Deterding LJ, Dix K, Burka LT, Tomer KB. On-line coupling of in vivo microdialysis with tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 1992;64:2636-41.

135. Hogan BL, Lunte SM, Stobaugh JF, Lunte CE. On-line coupling of in vivo microdialysis sampling with capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 1994;66:596-602.
136. Chen A, Lunte CE. Microdialysis sampling coupled on-line to fast microbore liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1995;691:29-35.
137. Lonnroth P, Jansson PA, Fredholm BB, Smith U. Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am J Physiol.* 1989;256:E250-5.
138. Yergey JA, Heyes MP. Brain eicosanoid formation following acute penetration injury as studied by in vivo microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1990;10:143-6.
139. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Regional cerebral glucose phosphorylation and blood flow after insertion of a microdialysis fiber through the dorsal hippocampus in the rat. *J Neurochem.* 1987;49:729-34.
140. Ault JM, Riley CM, Meltzer NM, Lunte CE. Dermal microdialysis sampling in vivo. *Pharm Res.* 1994;11:1631-9.
141. Davies MI, Lunte CE. Microdialysis sampling for hepatic metabolism studies. Impact of microdialysis probe design and implantation technique on liver tissue. *Drug Metab Dispos.* 1995;23:1072-9.
142. Anderson C, Andersson T, Wardell K. Changes in skin circulation after insertion of a microdialysis probe visualized by laser Doppler perfusion imaging. *J Invest Dermatol.* 1994;102:807-11.
143. de Lange EC, Danhof M, Zurcher C, de Boer AG, Breimer DD. Repeated microdialysis perfusions: periprobe tissue reactions and BBB permeability. *Brain Res.* 1995;702:261-5.
144. Shuaib A, Xu K, Crain B, Siren AL, Feuerstein G, Hallenbeck J, Davis JN. Assessment of damage from implantation of microdialysis probes in the rat hippocampus with silver degeneration staining. *Neurosci Lett.* 1990;112:149-54.
145. Imperato A, Di Chiara G. Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. *J Neurosci.* 1984;4:966-77.
146. Ruggeri M, Merlo Pich E, Zini I, Fuxe K, Ungerstedt U, Agnati LF. Indole-pyruvic acid increases 5-hydroxyindoleacetic acid levels in the cerebrospinal fluid and frontoparietal cortex of the rat: a microdialysis study. *Acta Physiol Scand.* 1990;138:97-8.
147. L'Heureux R, Dennis T, Curet O, Scatton B. Measurement of endogenous noradrenaline release in the rat cerebral cortex in vivo by transcortical dialysis: effects of drugs affecting noradrenergic transmission. *J Neurochem.* 1986;46:1794-801.
148. Lonnroth P, Jansson PA, Smith U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol.* 1987;253:E228-31.



149. Jansson PA, Veneman T, Nurjhan N, Gerich J. An improved method to calculate adipose tissue interstitial substrate recovery for microdialysis studies. *Life Sci.* 1994;54:1621-4.
150. Larsson CI. The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. *Life Sci.* 1991;49:PL73-8.
151. Bouw MR, Hammarlund-Udenaes M. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis-further development of the retrodialysis method. *Pharm Res.* 1998;15:1673-9.
152. Johnson RD, Justice JB. Model studies for brain dialysis. *Brain Res Bull.* 1983;10:567-71.
153. Wages SA, Church WH, Justice JB, Jr. Sampling considerations for on-line microbore liquid chromatography of brain dialysate. *Anal Chem.* 1986;58:1649-56.
154. Lindefors N, Amberg G, Ungerstedt U. Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusion kinetics. *J Pharmacol Methods.* 1989;22:141-56.
155. Muller M, Schmid R, Georgopoulos A, Buxbaum A, Wasicek C, Eichler HG. Application of microdialysis to clinical pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1995;57:371-80.
156. Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL. Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. *Life Sci.* 1990;46:105-19.
157. Telting-Diaz M, Scott DO, Lunte CE. Intravenous microdialysis sampling in awake, freely-moving rats. *Anal Chem.* 1992;64:806-10.
158. Stenken JA, Topp EM, Southard MZ, Lunte CE. Examination of microdialysis sampling in a well-characterized hydrodynamic system. *Anal Chem.* 1993;65:2324-8.
159. Olson RJ, Justice JB, Jr. Quantitative microdialysis under transient conditions. *Anal Chem.* 1993;65:1017-22.
160. Yokel RA, Allen DD, Burgio DE, McNamara PJ. Antipyrine as a dialyzable reference to correct differences in efficiency among and within sampling devices during in vivo microdialysis. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1992;27:135-42.
161. Scheller D, Kolb J. The internal reference technique in microdialysis: a practical approach to monitoring dialysis efficiency and to calculating tissue concentration from dialysate samples. *J Neurosci Methods.* 1991;40:31-8.
162. Stahle L. Drug distribution studies with microdialysis: I. Tissue dependent difference in recovery between caffeine and theophylline. *Life Sci.* 1991;49:1835-42.
163. Le Quellec A, Dupin S, Tufenkji AE, Genissel P, Houin G. Microdialysis: an alternative for in vitro and in vivo protein binding studies. *Pharm Res.* 1994;11:835-8.
164. Kabbaj M, Yamaguchi N, Varin F. Impact of the peripheral elimination on the muscle interstitial concentrations of remifentanyl in anaesthetized dogs: a proposed correction factor. *Br J Pharmacol.* 2005;Submitted.
165. de la Pena A, Liu P, Derendorf H. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;45:189-216.

166. Stahl M, Bouw R, Jackson A, Pay V. Human microdialysis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3:165-78.
167. Matos FF, Rollema H, Basbaum AI. Simultaneous measurement of extracellular morphine and serotonin in brain tissue and CSF by microdialysis in awake rats. *J Neurochem.* 1992;58:1773-81.
168. Aasmundstad TA, Morland J, Paulsen RE. Distribution of morphine 6-glucuronide and morphine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;275:435-41.
169. Stain-Textier F, Boschi G, Sandouk P, Scherrmann JM. Elevated concentrations of morphine 6-beta-D-glucuronide in brain extracellular fluid despite low blood-brain barrier permeability. *Br J Pharmacol.* 1999;128:917-24.
170. Bouw MR, Gardmark M, Hammarlund-Udenaes M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of morphine transport across the blood-brain barrier as a cause of the antinociceptive effect delay in rats--a microdialysis study. *Pharm Res.* 2000;17:1220-7.
171. Xie R, Hammarlund-Udenaes M. Blood-brain barrier equilibration of codeine in rats studied with microdialysis. *Pharm Res.* 1998;15:570-5.
172. Bernards CM, Sorkin LS. Radicular artery blood flow does not redistribute fentanyl from the epidural space to the spinal cord. *Anesthesiology.* 1994;80:872-8.
173. Mindermann T, Landolt H, Zimmerli W, Rajacic Z, Gratzl O. Penetration of rifampicin into the brain tissue and cerebral extracellular space of rats. *J Antimicrob Chemother.* 1993;31:731-7.
174. Granero L, Santiago M, Cano J, Machado A, Peris JE. Analysis of ceftriaxone and ceftazidime distribution in cerebrospinal fluid of and cerebral extracellular space in awake rats by in vivo microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2728-31.
175. Yang H, Wang Q, Elmquist WF. Fluconazole distribution to the brain: a crossover study in freely-moving rats using in vivo microdialysis. *Pharm Res.* 1996;13:1570-5.
176. Wong SL, Wang Y, Sawchuk RJ. Analysis of zidovudine distribution to specific regions in rabbit brain using microdialysis. *Pharm Res.* 1992;9:332-8.
177. Ljungdahl-Stahle E, Guzenda E, Bottiger D, Wahren B, Oberg B, Stahle L. Penetration of zidovudine and 3'-fluoro-3'-deoxythymidine into the brain, muscle tissue, and veins in cynomolgus monkeys: relation to antiviral action. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:2418-22.
178. Stahle L, Oberg B. Pharmacokinetics and distribution over the blood brain barrier of two acyclic guanosine analogs in rats, studied by microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:339-42.
179. Golden PL, Brouwer KR, Pollack GM. Assessment of valproic acid serum-cerebrospinal fluid transport by microdialysis. *Pharm Res.* 1993;10:1765-71.
180. Van Belle K, Dzeka T, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. In vitro and in vivo microdialysis calibration for the measurement of carbamazepine and its metabolites

- in rat brain tissue using the internal reference technique. *J Neurosci Methods*. 1993;49:167-73.
181. Nakazono T, Murakami T, Sakai S, Higashi Y, Yata N. Application of microdialysis for study of caffeine distribution into brain and cerebrospinal fluid in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992;40:2510-5.
  182. Stahle L, Segersvard S, Ungerstedt U. Drug distribution studies with microdialysis. II. Caffeine and theophylline in blood, brain and other tissues in rats. *Life Sci*. 1991;49:1843-52.
  183. Telting-Diaz M, Lunte CE. Distribution of tacrine across the blood-brain barrier in awake, freely moving rats using in vivo microdialysis sampling. *Pharm Res*. 1993;10:44-8.
  184. de Lange EC, de Vries JD, Zurcher C, Danhof M, de Boer AG, Breimer DD. The use of intracerebral microdialysis for the determination of pharmacokinetic profiles of anticancer drugs in tumor-bearing rat brain. *Pharm Res*. 1995;12:1924-31.
  185. Dykstra KH, Arya A, Arriola DM, Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL. Microdialysis study of zidovudine (AZT) transport in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;267:1227-36.
  186. Wang Y, Welty DF. The simultaneous estimation of the influx and efflux blood-brain barrier permeabilities of gabapentin using a microdialysis-pharmacokinetic approach. *Pharm Res*. 1996;13:398-403.
  187. Deguchi Y, Inabe K, Tomiyasu K, Nozawa K, Yamada S, Kimura R. Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis. *Pharm Res*. 1995;12:1838-44.
  188. Wang Q, Yang H, Miller DW, Elmquist WF. Effect of the p-glycoprotein inhibitor, cyclosporin A, on the distribution of rhodamine-123 to the brain: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;211:719-26.
  189. Burgio DE, Gosland MP, McNamara PJ. Modulation effects of cyclosporine on etoposide pharmacokinetics and CNS distribution in the rat utilizing microdialysis. *Biochem Pharmacol*. 1996;51:987-92.
  190. Xie R, Hammarlund-Udenaes M, de Boer AG, de Lange EC. The role of P-glycoprotein in blood-brain barrier transport of morphine: transcortical microdialysis studies in *mdr1a* (-/-) and *mdr1a* (+/+) mice. *Br J Pharmacol*. 1999;128:563-8.
  191. Desrayaud S, Guntz P, Scherrmann JM, Lemaire M. Effect of the P-glycoprotein inhibitor, SDZ PSC 833, on the blood and brain pharmacokinetics of colchicine. *Life Sci*. 1997;61:153-63.
  192. Huwyler J, Rufer S, Kusters E, Drewe J. Rapid and highly automated determination of morphine and morphine glucuronides in plasma by on-line solid-phase extraction and column liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1995;674:57-63.
  193. Barjavel MJ, Scherrmann JM, Bhargava HN. Relationship between morphine analgesia and cortical extracellular fluid levels of morphine and its metabolites in the rat: a microdialysis study. *Br J Pharmacol*. 1995;116:3205-10.



194. Stain F, Barjavel MJ, Sandouk P, Plotkine M, Scherrmann JM, Bhargava HN. Analgesic response and plasma and brain extracellular fluid pharmacokinetics of morphine and morphine-6-beta-D-glucuronide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274:852-7.
195. Welty DF, Schielke GP, Vartanian MG, Taylor CP. Gabapentin anticonvulsant action in rats: disequilibrium with peak drug concentrations in plasma and brain microdialysate. *Epilepsy Res*. 1993;16:175-81.
196. Segal MB. Extracellular and cerebrospinal fluids. *J Inherit Metab Dis*. 1993;16:617-38.
197. Tortora GJ, Grabowski SR. *Principe d'anatomie et de physiologie*. Saint Laurent (Québec): Éditions du nouveau pédagogique Inc.; 2001.
198. Walker MC, Tong X, Perry H, Alavijeh MS, Patsalos PN. Comparison of serum, cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid pharmacokinetics of lamotrigine. *Br J Pharmacol*. 2000;130:242-8.
199. Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2003;6:252-73.
200. Nolting A, Costa TD, Vistelle R, Rand KH, Derendorf H. Determination of free extracellular concentrations of piperacillin by microdialysis. *J Pharm Sci*. 1996;85:369-72.
201. DeGuchi Y, Terasaki T, Yamada H, Tsuji A. An application of microdialysis to drug tissue distribution study: in vivo evidence for free-ligand hypothesis and tissue binding of beta-lactam antibiotics in interstitial fluids. *J Pharmacobiodyn*. 1992;15:79-89.
202. Dalla Costa T, Nolting A, Kovar A, Derendorf H. Determination of free interstitial concentrations of piperacillin-tazobactam combinations by microdialysis. *J Antimicrob Chemother*. 1998;42:769-78.
203. Eisenberg EJ, Conzentino P, Eickhoff WM, Cundy KC. Pharmacokinetic measurement of drugs in lung epithelial lining fluid by microdialysis: aminoglycoside antibiotics in rat bronchi. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993;29:93-8.
204. Sasongko L, Ramzan I, Williams KM, McLachlan AJ. Muscle distribution of the neuromuscular blocker gallamine using microdialysis. *J Pharm Sci*. 2002;91:769-75.
205. Lonnroth P, Carlsten J, Johnson L, Smith U. Measurements by microdialysis of free tissue concentrations of propranolol. *J Chromatogr*. 1991;568:419-25.
206. Kuzmin AI, Tskitishvili OV, Serebryakova LI, Kapelko VI, Majorova IV, Medvedev OS. Allopurinol: kinetics, inhibition of xanthine oxidase activity, and protective effect in ischemic-reperfused canine heart as studied by cardiac microdialysis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25:564-71.
207. Scott DO, Sorenson LR, Steele KL, Puckett DL, Lunte CE. In vivo microdialysis sampling for pharmacokinetic investigations. *Pharm Res*. 1991;8:389-92.

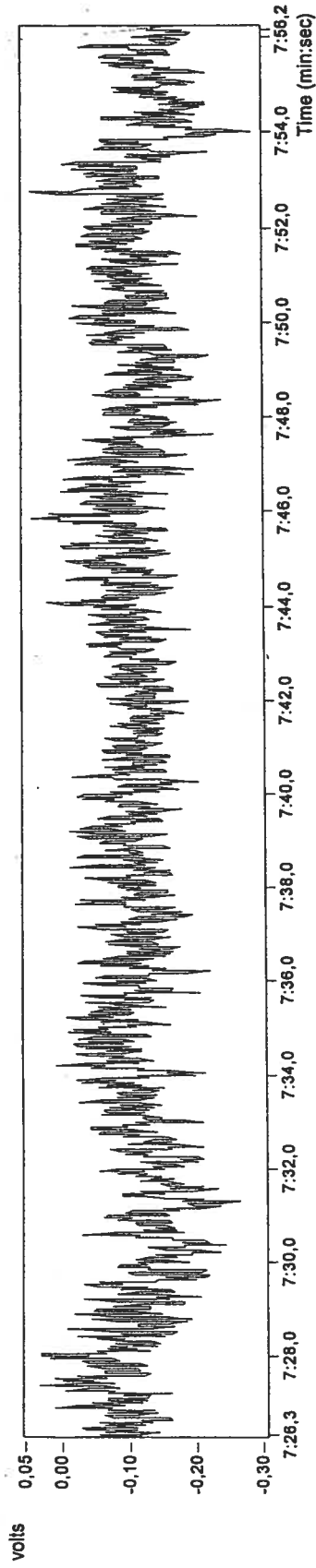


**ANNEXE I**  
**Électroencéphalogrammes : tracés bruts**

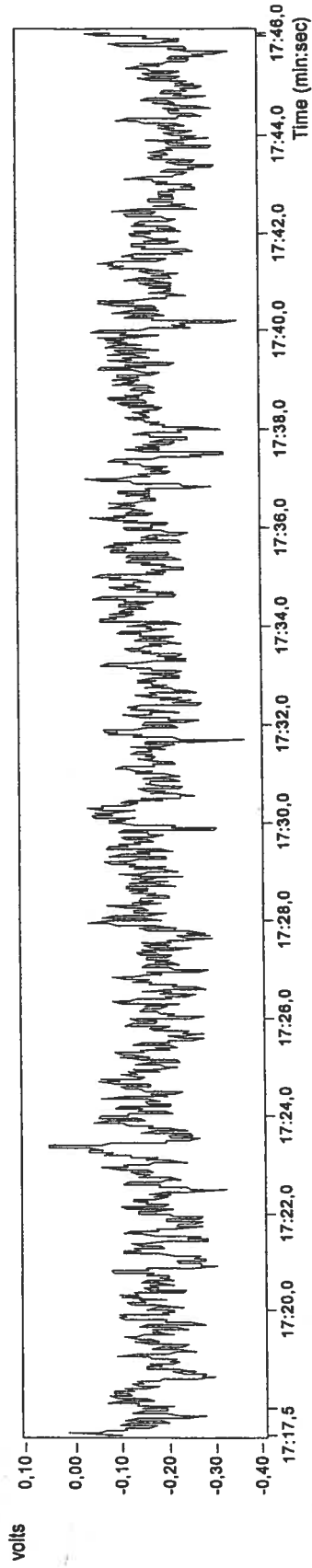


Université de Montréal

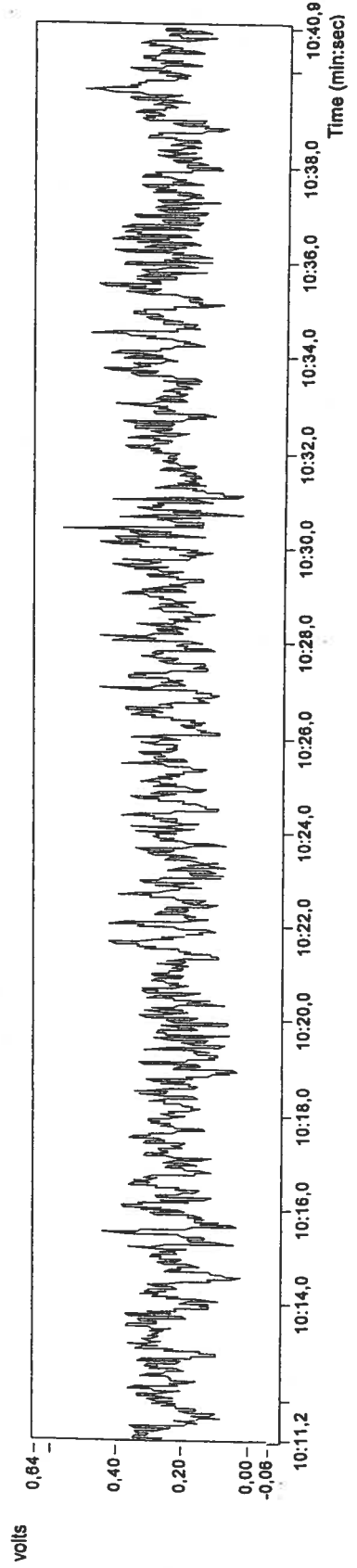
## Chien 2



## Chien 3

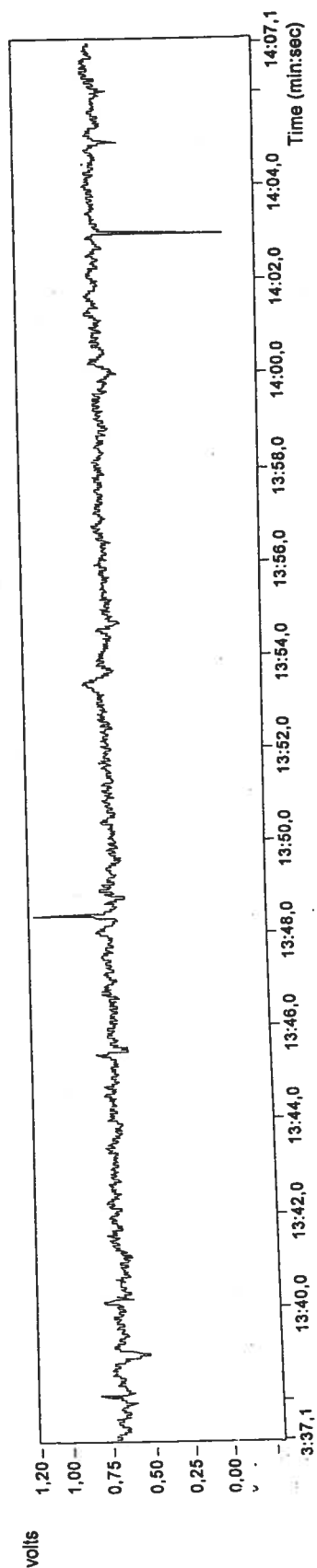


## Chien 4

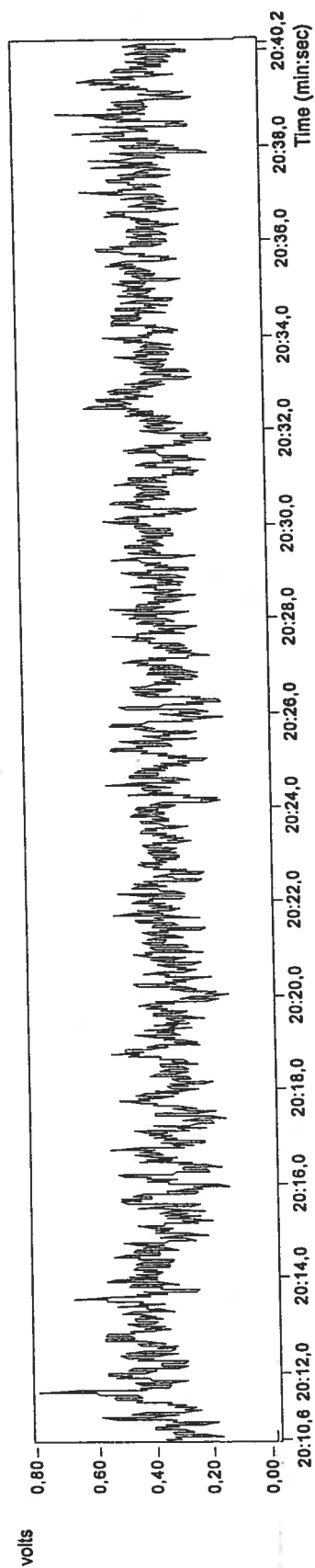




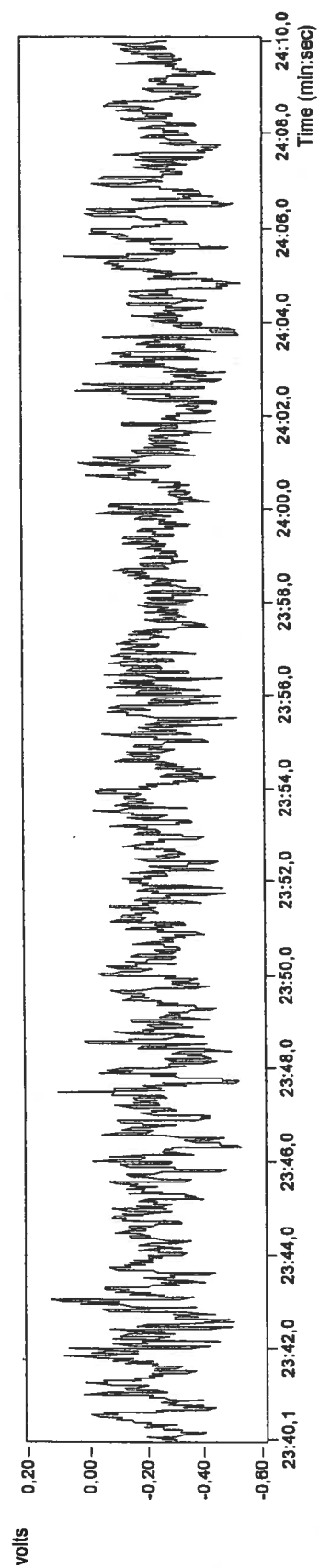
### Chien 5



### Chien 6



### Chien 7



**ANNEXE II**  
**Discrimination entre les modèles pharmacocinétiques**



Université de Montréal

Modèle à un compartiment après un bolus  
(Résultats WinNonlin)



Input File: Workbook - [Untitled1]

Date: 03/11/2005  
Time: 19:09:36

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM (V4.0.1)  
Listing of input commands

```
MODEL 1
N VARIABLES 2
NPOINTS 1000
XNUMBER 1
YNUMBER 2
NCONSTANTS 3
CONSTANTS 1,4035000,0
METHOD 2 'Gauss-Newton (Levenberg and Hartley)'
REWEIGHT -1
ITERATIONS 50
MISSING 'Missing'
DATA 'WINNLIN.DAT'
BEGIN
```

Computation of initial estimates completed.

The following default parameter boundaries were generated.

Parameter	Lower Bound	Upper Bound
V	0.000	0.1118E+05
K10	0.000	0.8707

Date: 03/11/2005  
Time: 19:09:36

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

```
ITERATION WEIGHTED_SS V K10
0 78401.6 1118. 0.8707E-01
RANK = 2 CONDITION NO. = 2.455
1 14883.9 287.2 0.9355E-01
RANK = 2 CONDITION NO. = 2.610
2 9461.98 251.3 0.1476
RANK = 2 CONDITION NO. = 2.770
UNIVARIATE SEARCH CANNOT REDUCE THE RESIDUAL SS
2 9461.98 251.3 0.1476
```

Date: 03/11/2005  
Time: 19:09:36

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD_ERROR	CV%
UNIVAR_CI_LOW	UNIVAR_CI_UPP	PLANAR_CI_LOW	PLANAR_CI_UPP	
V	-	251.334442	84.765093	33.73

50.895239      451.773645      -26.014158      528.683042

         K10      ~      0.147624      0.043601      29.53  
0.044524      0.250725      0.004964      0.290285

Date: 03/11/2005

Time: 19:09:36

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* VARIANCE - COVARIANCE MATRIX OF THE ESTIMATES \*\*\*

PARAMETER	V	K10
V	7185.12	
K10	-2.72643	0.190103E-02

\*\*\* CORRELATION MATRIX OF THE ESTIMATES \*\*\*

PARAMETER	V	K10
V	1.00000	
K10	-0.737706	1.00000

\*\*\* EIGENVALUES OF (Var - Cov) MATRIX \*\*\*

NUMBER	EIGENVALUE
1	0.1560E+07
2	0.1881

Condition\_number= 2880.

Date: 03/11/2005

Time: 19:09:36

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* SUMMARY OF NONLINEAR ESTIMATION \*\*\*

FUNCTION 1

X	OBSERVED Y	PREDICTED Y	RESIDUAL	WEIGHT	SE-PRED	STANDARDIZED RESIDUAL
2.000	0.1833E+05	0.1195E+05	6380.	0.8371E-04	3334.	2.844
5.000	3613.	7674.	-4061.	0.1304E-03	1762.	-1.507
10.00	1320.	3668.	-2348.	0.2730E-03	1080.	-1.207
15.00	605.8	1754.	-1148.	0.5716E-03	814.2	-0.8797
20.00	293.9	838.2	-544.3	0.1197E-02	555.4	-0.6006
30.00	97.30	191.5	-94.22	0.5244E-02	207.1	-0.2033
45.00	26.10	20.92	5.181	0.4812E-01	36.04	0.3166E-01

60.00	19.30	2.285	17.02	0.4416	5.410	0.3090
80.00	11.70	0.1193	11.58	8.483	0.3851	0.9178

CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 0.285547E+09  
 WEIGHTED CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 30611.9  
 SUM OF SQUARED RESIDUALS = 0.643351E+08  
 SUM OF WEIGHTED SQUARED RESIDUALS = 9484.20  
 S = 36.8088 WITH 7 DEGREES OF FREEDOM  
 CORRELATION (OBSERVED,PREDICTED) = 0.9019

AIC criteria = 86.41644  
 SBC criteria = 86.81089

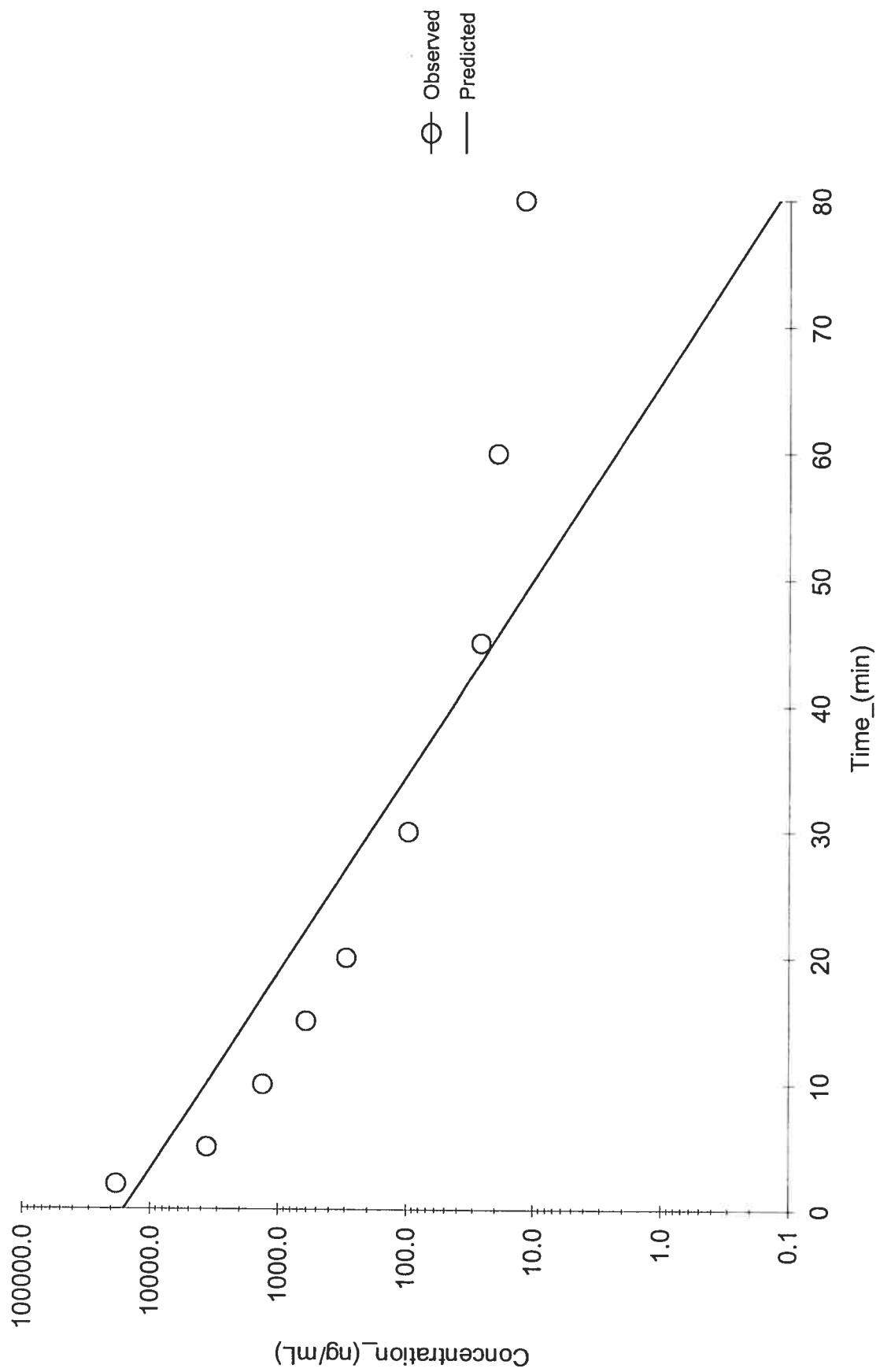
Date: 03/11/2005  
 Time: 19:09:37

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

# SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD_ERROR	CV%
AUC	~	108751.173019	25248.707220	23.22
K10_HL	~	4.695349	1.385386	29.51
Cmax	~	16054.305855	5409.068602	33.69
CL	~	37.103048	8.622811	23.24
AUMC	~	736675.739199	302128.319854	41.01
MRT	~	6.773957	1.998689	29.51
Vss	~	251.334442	84.765093	33.73

NORMAL ENDING



Modèle à deux compartiments après un bolus  
(Résultats WinNonlin)





Input File: Workbook - [Untitled1]

Date: 03/11/2005  
Time: 19:12:07

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM (V4.0.1)  
Listing of input commands

```
MODEL 8
N VARIABLES 2
NPOINTS 1000
XNUMBER 1
YNUMBER 2
NCONSTANTS 4
CONSTANTS 4035000,1,4035000,0
METHOD 2 'Gauss-Newton (Levenberg and Hartley)'
REWEIGHT -1
ITERATIONS 50
MISSING 'Missing'
DATA 'WINNLIN.DAT'
BEGIN
```

Computation of initial estimates completed.

The following default parameter boundaries were generated.

Parameter	Lower Bound	Upper Bound
A	0.000	0.5955E+06
B	0.000	0.1276E+05
Alpha	0.000	6.213
Beta	0.000	0.6775

Date: 03/11/2005  
Time: 19:12:07

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

ITERATION	WEIGHTED_SS	A	B	Alpha	Beta	
0	499.002	0.5955E+05	1276.	0.6213		0.6775E-01
		RANK = 4 CONDITION NO. = 16.63				
1	250.608	0.6053E+05	2111.	0.6469		0.8988E-01
		RANK = 4 CONDITION NO. = 18.60				
2	234.662	0.6176E+05	2408.	0.6645		0.9521E-01
		RANK = 4 CONDITION NO. = 18.96				
3	234.157	0.6214E+05	2481.	0.6693		0.9640E-01
		RANK = 4 CONDITION NO. = 19.03				
UNIVARIATE SEARCH CANNOT REDUCE THE RESIDUAL SS						
3	234.157	0.6214E+05	2481.	0.6693		0.9640E-01

Date: 03/11/2005  
Time: 19:12:07

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* WARNING \*\*\*

VARIANCE - COVARIANCE MATRIX IS NOT OF FULL RANK OR  
IS ILL-CONDITIONED. PARAMETER ESTIMATES AND THEIR  
ASSOCIATED STANDARD ERRORS SHOULD BE INTERPRETED  
WITH CAUTION.

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD_ERROR	CV%
UNIVAR_CI_LOW	UNIVAR_CI_UPP	PLANAR_CI_LOW	PLANAR_CI_UPP	
A	~	62138.601034	10161.789695	16.35
37273.579453	87003.622615	18114.286244	106162.915825	
B	~	2480.539478	901.764189	36.35
274.000405	4687.078552	-1426.208419	6387.287375	
Alpha	~	0.669312	0.083882	12.53
0.464062	0.874563	0.305909	1.032716	
Beta	~	0.096395	0.020055	20.81
0.047322	0.145468	0.009510	0.183281	

Date: 03/11/2005  
Time: 19:12:07

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* VARIANCE - COVARIANCE MATRIX OF THE ESTIMATES \*\*\*

PARAMETER	A	B	Alpha	Beta
A	0.103262E+09			
B	0.420507E+07	813179.		
Alpha	786.097	51.7949	0.703612E-02	
Beta	72.2987	16.4748	0.939875E-03	0.402207E-03

\*\*\* CORRELATION MATRIX OF THE ESTIMATES \*\*\*

PARAMETER	A	B	Alpha	Beta
A	1.00000			
B	0.458892	1.00000		
Alpha	0.922230	0.684743	1.00000	
Beta	0.354761	0.910964	0.558700	1.00000

\*\*\* EIGENVALUES OF (Var - Cov) MATRIX \*\*\*

NUMBER	EIGENVALUE
1	0.6061E+06
2	0.8786E+05
3	0.6090E-04

4 0.3773E-06

Condition\_number= 0.1267E+07

Date: 03/11/2005  
Time: 19:12:07

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* SUMMARY OF NONLINEAR ESTIMATION \*\*\*

FUNCTION 1

X	OBSERVED Y	PREDICTED Y	RESIDUAL	WEIGHT	SE-PRED	STANDARDIZED RESIDUAL
2.000	0.1833E+05	0.1834E+05	-8.701	0.5453E-04	845.8	-0.5343
5.000	3613.	3719.	-106.5	0.2689E-03	378.8	-2.653
10.00	1320.	1023.	297.0	0.9783E-03	154.1	2.337
15.00	605.8	586.9	18.85	0.1706E-02	87.68	0.1530
20.00	293.9	360.9	-67.00	0.2776E-02	59.62	-0.6537
30.00	97.30	137.6	-40.30	0.7288E-02	42.51	-0.6767
45.00	26.10	32.41	-6.309	0.3099E-01	19.11	-0.2110
60.00	19.30	7.633	11.67	0.1318	6.737	0.7367
80.00	11.70	1.110	10.59	0.9076	1.418	1.654

CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 0.285547E+09  
WEIGHTED CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 24304.5  
SUM OF SQUARED RESIDUALS = 106351.  
SUM OF WEIGHTED SQUARED RESIDUALS = 235.184  
S = 6.26078 WITH 6 DEGREES OF FREEDOM  
CORRELATION (OBSERVED,PREDICTED) = 0.9998

AIC criteria = 57.14333  
SBC criteria = 57.93223

Date: 03/11/2005  
Time: 19:12:07

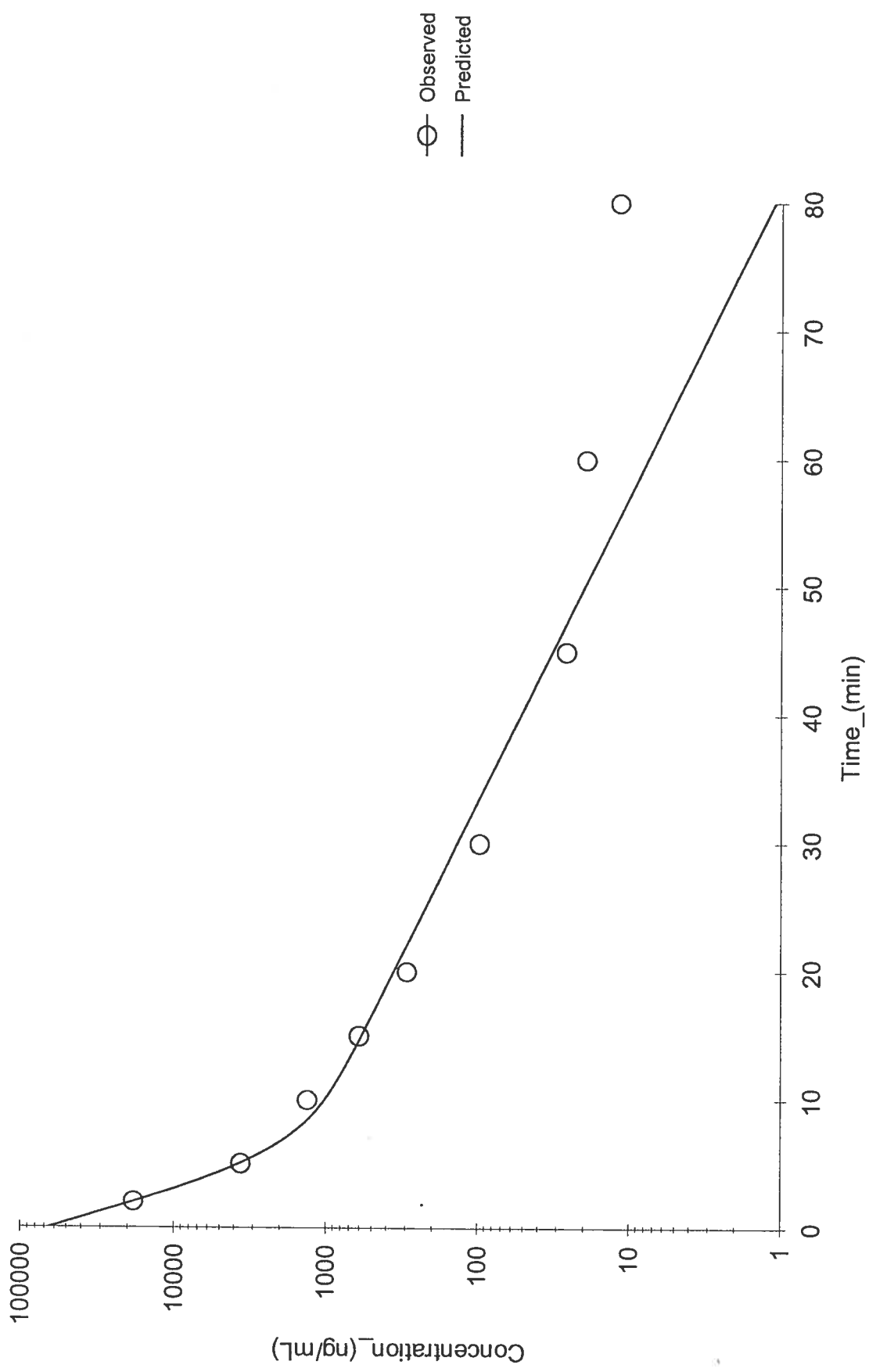
WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
AUC	~	118572.444417	7639.819758	6.44
K10_HL	~	1.271886	0.139739	10.99
Alpha_HL	~	1.035611	0.129658	12.52
Beta_HL	~	7.190675	1.494529	20.78
K10	~	0.544976	0.059924	11.00
K12	~	0.102344	0.024580	24.02
K21	~	0.118388	0.027103	22.89
Cmax	~	64619.140513	10605.908636	16.41
V1	~	62.442799	10.239283	16.40
CL	~	34.029829	2.187204	6.43
AUMC	~	405661.505366	47959.568648	11.82
MRT	~	3.421212	0.425560	12.44

Vss	116.423269	18.486682	15.88
V2	53.980470	11.787860	21.84
CLD2	6.390635	1.061020	16.60

NORMAL ENDING



Modèle à trois compartiments après un bolus  
(Résultats WinNonlin)



Input File: Workbook - [Untitled1]

Date: 03/29/2005

Time: 08:21:53

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM (V4.0.1)  
Listing of input commands

```
MODEL 18
N VARIABLES 2
NPOINTS 1000
XNUMBER 1
YNUMBER 2
NCONSTANTS 4
CONSTANTS 4400000,1,4400000,0
METHOD 2 'Gauss-Newton (Levenberg and Hartley)'
ITERATIONS 50
MISSING 'Missing'
DATA 'WINNLIN.DAT'
BEGIN
```

Computation of initial estimates completed.

The following default parameter boundaries were generated.

Parameter	Lower Bound	Upper Bound
A	0.000	0.1014E+07
B	0.000	0.6661E+05
C	0.000	1286.
Alpha	0.000	10.11
Beta	0.000	1.696
Gamma	0.000	0.3164

Date: 03/29/2005

Time: 08:21:53

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

ITERATION	WEIGHTED_SS	A	B	C	Alpha	Beta	Gamma						
0	2907.80	0.1014E+06	6661.		128.6								
0.3164E-01													
		RANK = 6 CONDITION NO. = 3049.											
1	93.5949	0.1010E+06	6617.		152.3								
0.3625E-01													
		RANK = 6 CONDITION NO. = 3378.											
2	91.8861	0.1012E+06	6628.		160.8								
0.3718E-01													
		RANK = 6 CONDITION NO. = 3383.											
3	91.8371	0.1013E+06	6632.		162.7								
0.3745E-01													
		RANK = 6 CONDITION NO. = 3397.											
CONVERGENCE ACHIEVED													
RELATIVE CHANGE IN WEIGHTED SUM OF SQUARES LESS THAN 0.000100													
3	91.8368	0.1013E+06	6632.		162.8								
0.3746E-01													

## WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

Date: 03/29/2005  
Time: 08:21:53

\*\*\* WARNING \*\*\*

VARIANCE - COVARIANCE MATRIX IS NOT OF FULL RANK OR  
IS ILL-CONDITIONED. PARAMETER ESTIMATES AND THEIR  
ASSOCIATED STANDARD ERRORS SHOULD BE INTERPRETED  
WITH CAUTION.

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD_ERROR	CV%
UNIVAR_CI_LOW	UNIVAR_CI_UPP	PLANAR_CI_LOW	PLANAR_CI_UPP	
A	~	101303.075649	3565.182185	3.52
91404.676955	111201.474344	79744.538586	122861.612713	
B	~	6632.431068	197.710545	2.98
6083.506019	7181.356116	5436.882033	7827.980103	
C	~	162.788825	69.304061	42.57
29.627493	355.205143	-256.290508	581.868158	
Alpha	~	1.009036	0.022666	2.25
0.946106	1.071967	0.871975	1.146097	
Beta	~	0.170650	0.005492	3.22
0.155401	0.185899	0.137439	0.203862	
Gamma	~	0.037464	0.009409	25.12
0.011340	0.063587	-0.019433	0.094361	

Date: 03/29/2005  
Time: 08:21:53

## WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* VARIANCE - COVARIANCE MATRIX OF THE ESTIMATES \*\*\*

PARAMETER	A	B	C	Alpha	Beta
Gamma					
A	0.127105E+08				
B	689840.	39089.5			
C	175804.	9523.87	4803.05		
Alpha	80.7054	4.41222	1.15503	0.513751E-03	
Beta	17.5228	0.985149	0.353138	0.113724E-03	
0.301651E-04					
Gamma	20.7445	1.08324	0.633422	0.136684E-03	
0.436109E-04	0.885326E-04				



```

*** CORRELATION MATRIX OF THE ESTIMATES ***
PARAMETER      A          B          C          Alpha          Beta
Gamma
A              1.00000
B              0.978671    1.00000
C              0.711522    0.695064    1.00000
Alpha          0.998722    0.984580    0.735289    1.00000
Beta          0.894892    0.907235    0.927756    0.913535
1.00000
Gamma          0.618399    0.582295    0.971366    0.640897
0.843901      1.00000

```

\*\*\* EIGENVALUES OF (Var - Cov) MATRIX \*\*\*

NUMBER	EIGENVALUE
1	0.9446E+09
2	0.3067E+09
3	0.7375E+07
4	0.1396E-01
5	0.9681E-02
6	0.1801E-05

Condition\_number= 0.2290E+08

Date: 03/29/2005  
Time: 08:21:53

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

\*\*\* SUMMARY OF NONLINEAR ESTIMATION \*\*\*

FUNCTION 1

X	OBSERVED Y	PREDICTED Y	RESIDUAL	WEIGHT	SE-PRED	STANDARDIZED RESIDUAL
2.000	0.1833E+05	0.1833E+05	0.6713E-03	1.000	4.792	2.756
5.000	3613.	3613.	-0.1416E-02	1.000	4.792	-0.1737
10.00	1320.	1320.	0.9101E-01	1.000	4.765	0.1816
15.00	605.8	605.7	0.1230	1.000	4.105	0.4976E-01
20.00	293.9	295.4	-1.538	1.000	3.253	-0.4372
30.00	97.30	92.56	4.737	1.000	3.892	1.695
45.00	26.10	33.23	-7.128	1.000	2.896	-1.867
60.00	19.30	17.43	1.868	1.000	3.150	0.5173
80.00	11.70	8.136	3.564	1.000	2.871	0.9289

CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 0.285547E+09  
 WEIGHTED CORRECTED SUM OF SQUARED OBSERVATIONS = 0.285547E+09  
 SUM OF SQUARED RESIDUALS = 91.8368  
 SUM OF WEIGHTED SQUARED RESIDUALS = 91.8368  
 S = 4.79157 WITH 4 DEGREES OF FREEDOM

CORRELATION (OBSERVED,PREDICTED) = 1.000

AIC criteria = 52.68011  
SBC criteria = 53.86346

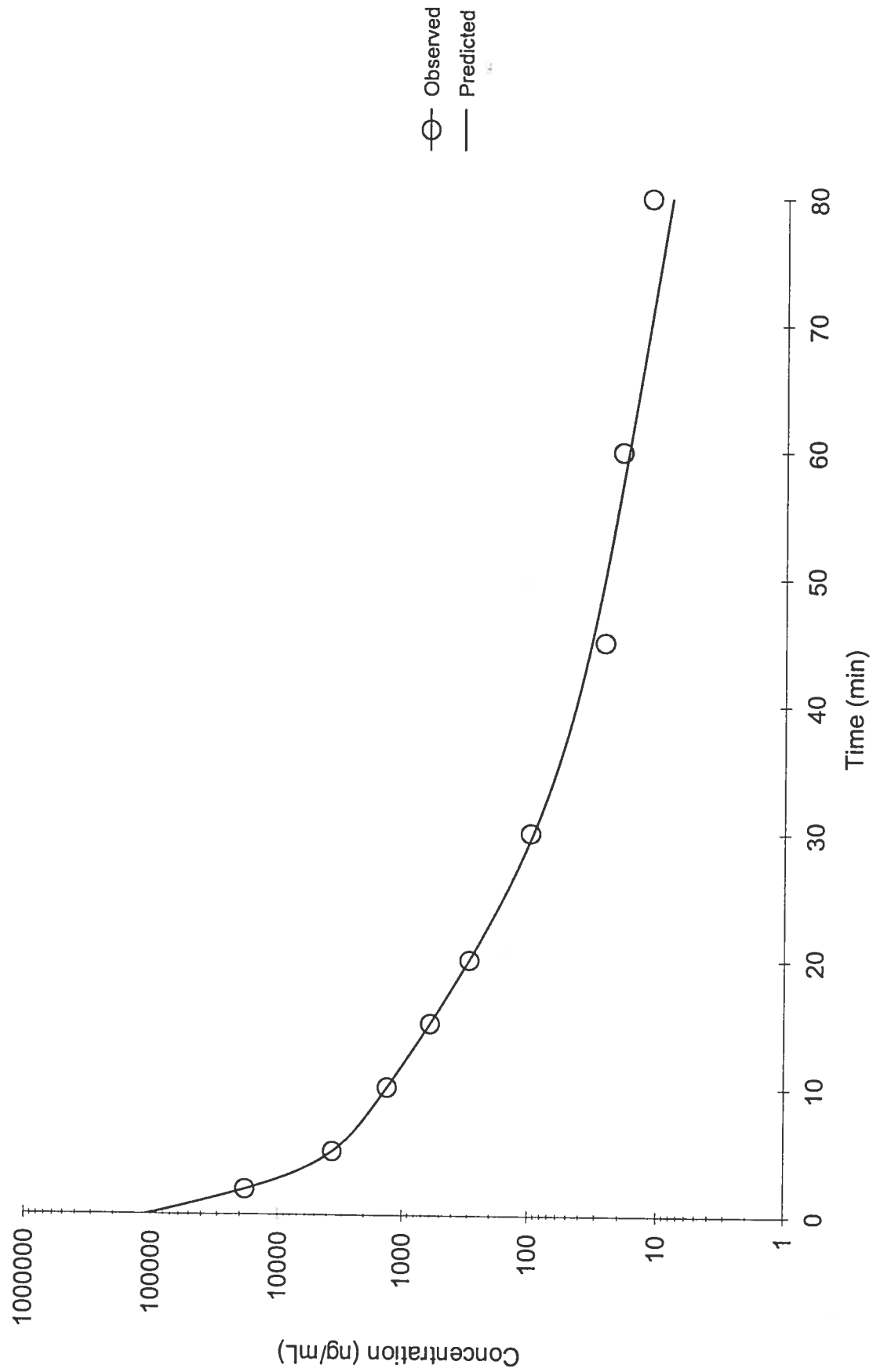
Date: 03/29/2005  
Time: 08:21:53

WINNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM

SUMMARY OF ESTIMATED SECONDARY PARAMETERS

PARAMETER	UNITS	ESTIMATE	STANDARD ERROR	CV%
Cmax	~	108098.295542	3808.510466	3.52
V1	~	40.703695	1.432808	3.52
K21	~	0.222500	0.006362	2.86
K31	~	0.038517	0.009814	25.48
K10	~	0.752738	0.016406	2.18
K12	~	0.184338	0.003253	1.76
K13	~	0.019058	0.003089	16.21
K10_HL	~	0.920834	0.020054	2.18
Alpha_HL	~	0.686940	0.015415	2.24
Beta_HL	~	4.061802	0.130596	3.22
Gamma_HL	~	18.501823	4.642170	25.09
AUC	~	143606.749164	1953.955995	1.36
CL	~	30.639228	0.415890	1.36
AUMC	~	443232.445071	21031.189441	4.74
MRT	~	3.086432	0.163687	5.30
Vss	~	94.565891	5.783845	6.12
V2	~	33.722367	1.749864	5.19
CLD2	~	7.503221	0.176818	2.36
V3	~	20.139829	3.636968	18.06
CLD3	~	0.775723	0.105008	13.54

NORMAL ENDING

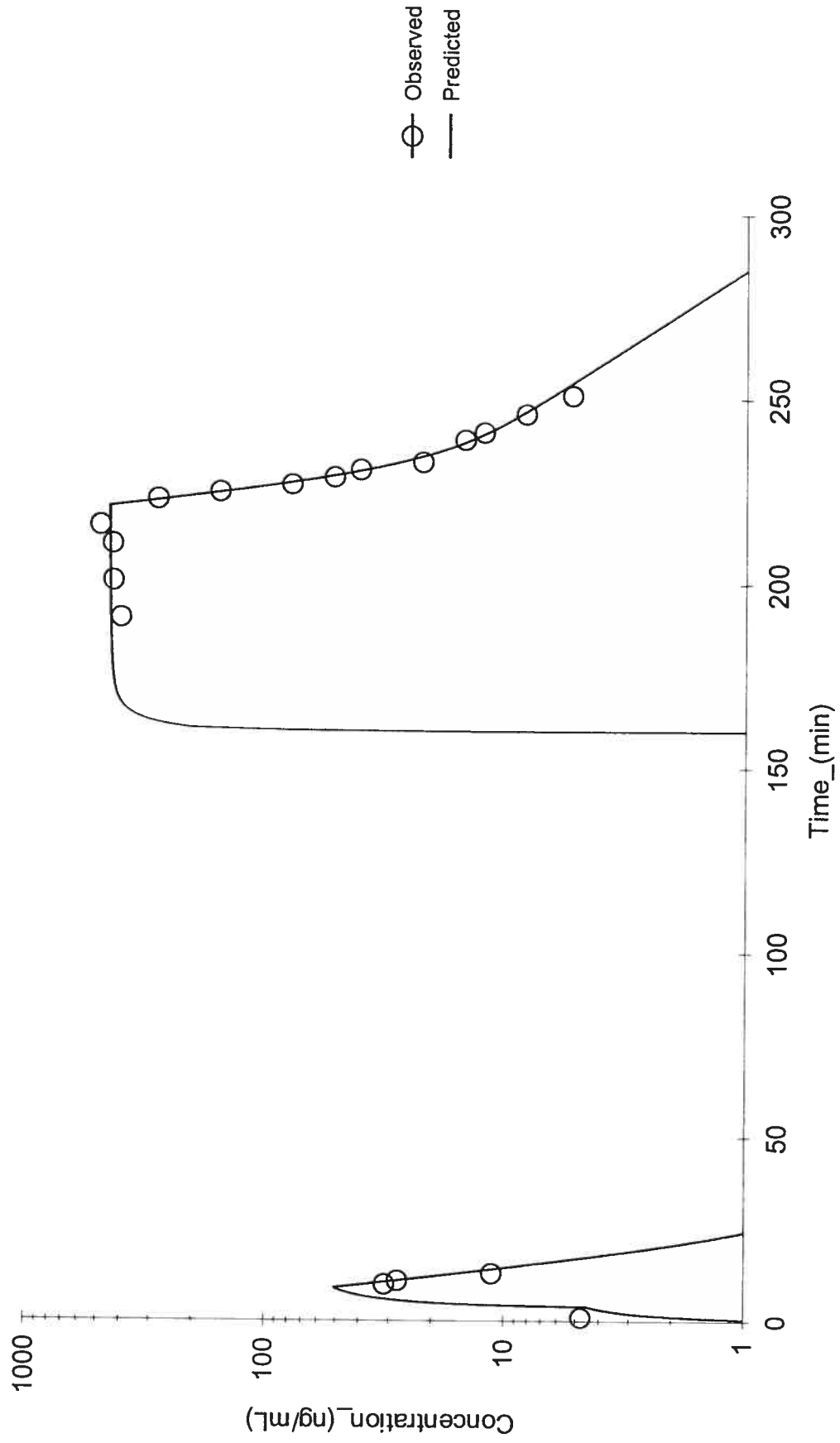


**ANNEXE III**  
**Modélisation Pharmacocinétique**

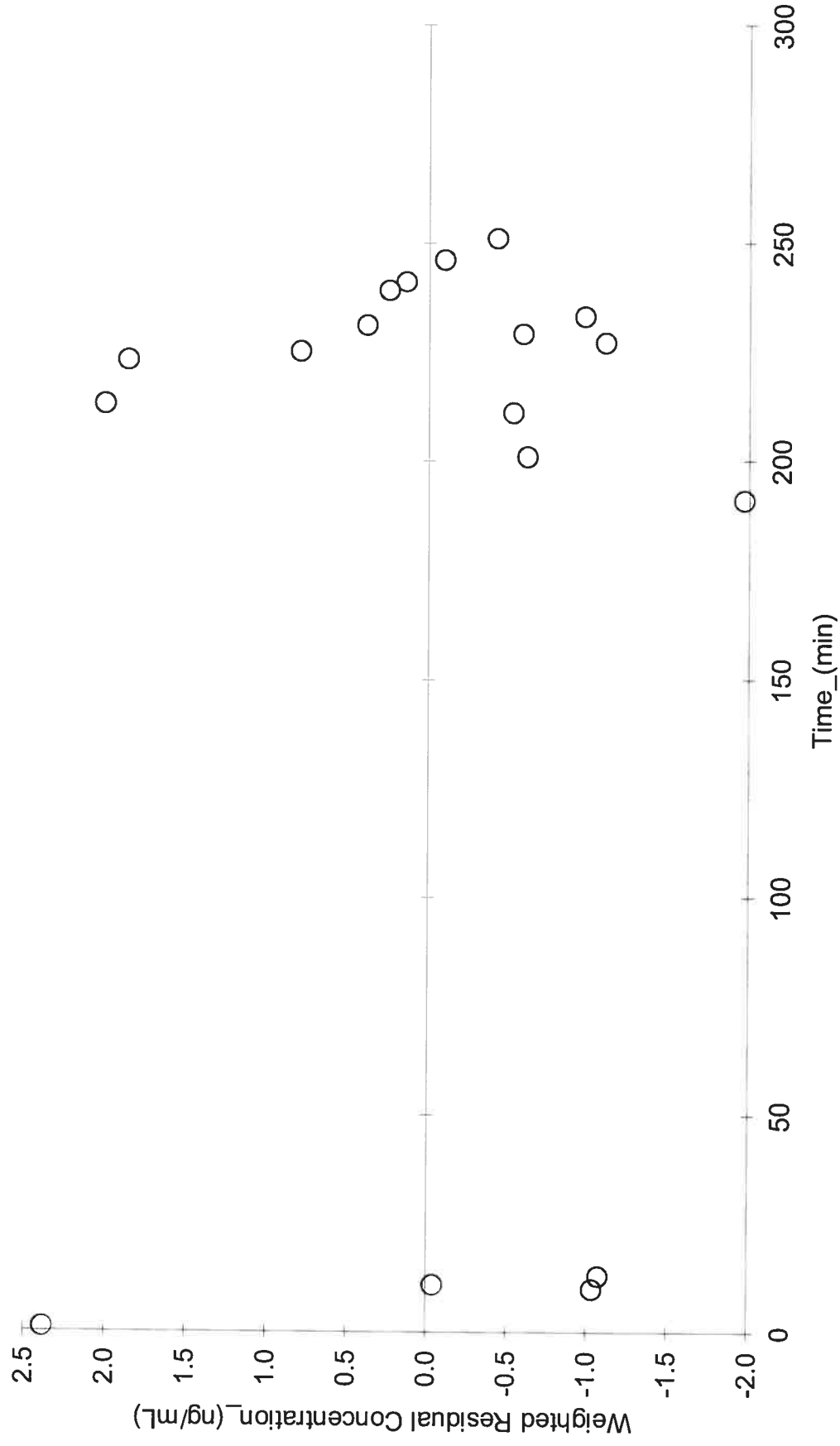
Données observées / prédites  
Graphiques des résiduelles en fonction du temps



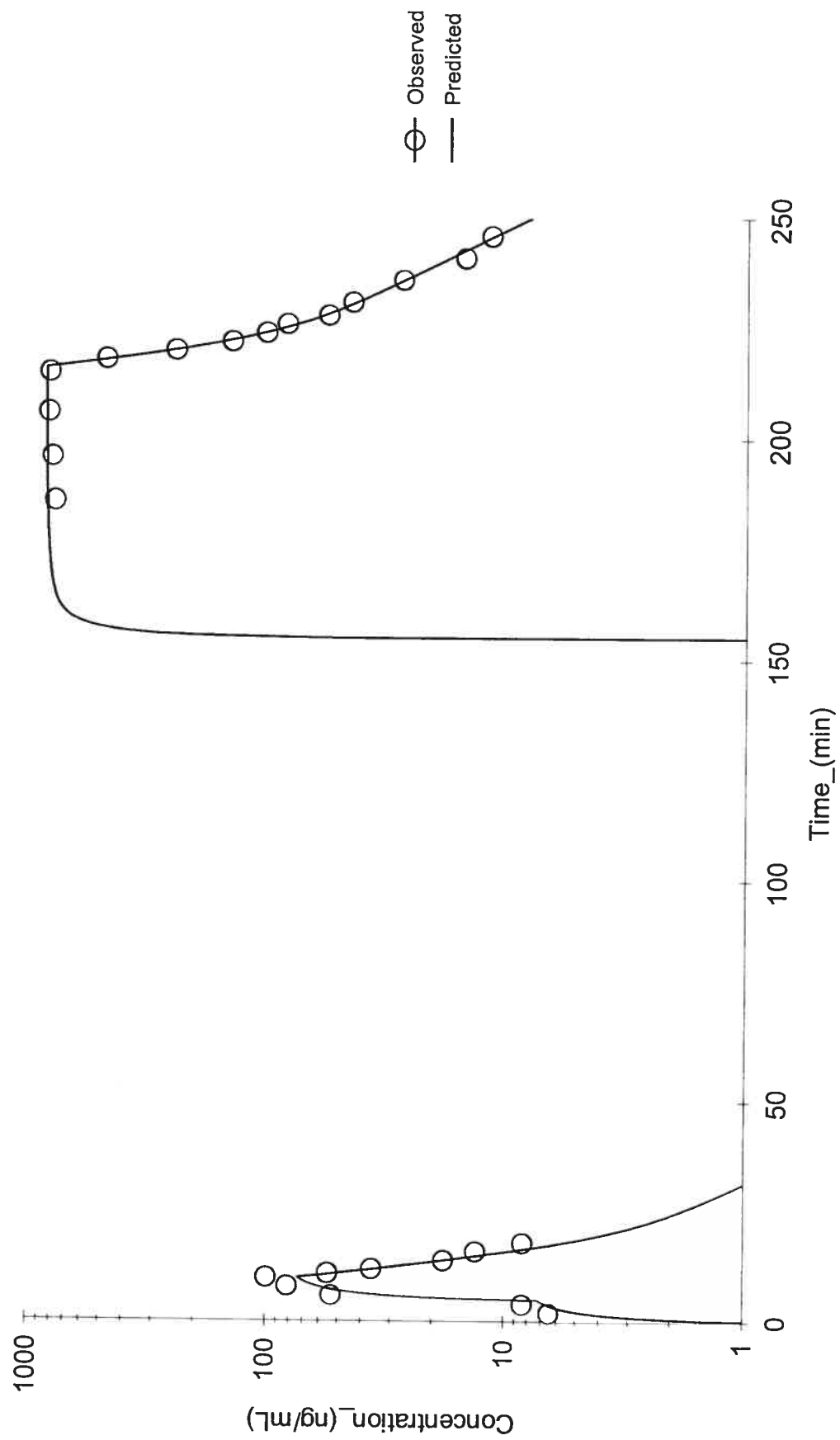
Chien #1

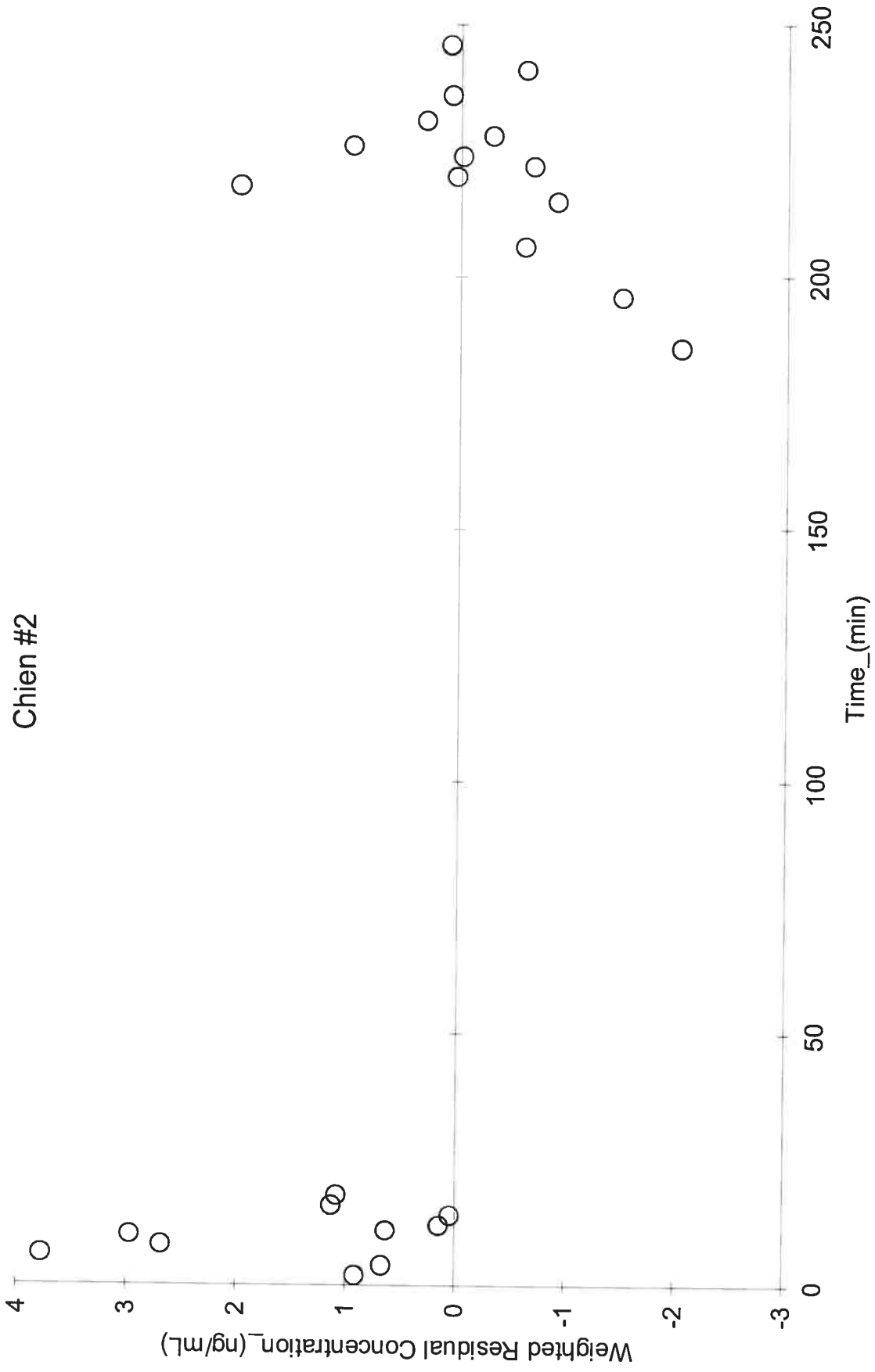


Chien #1



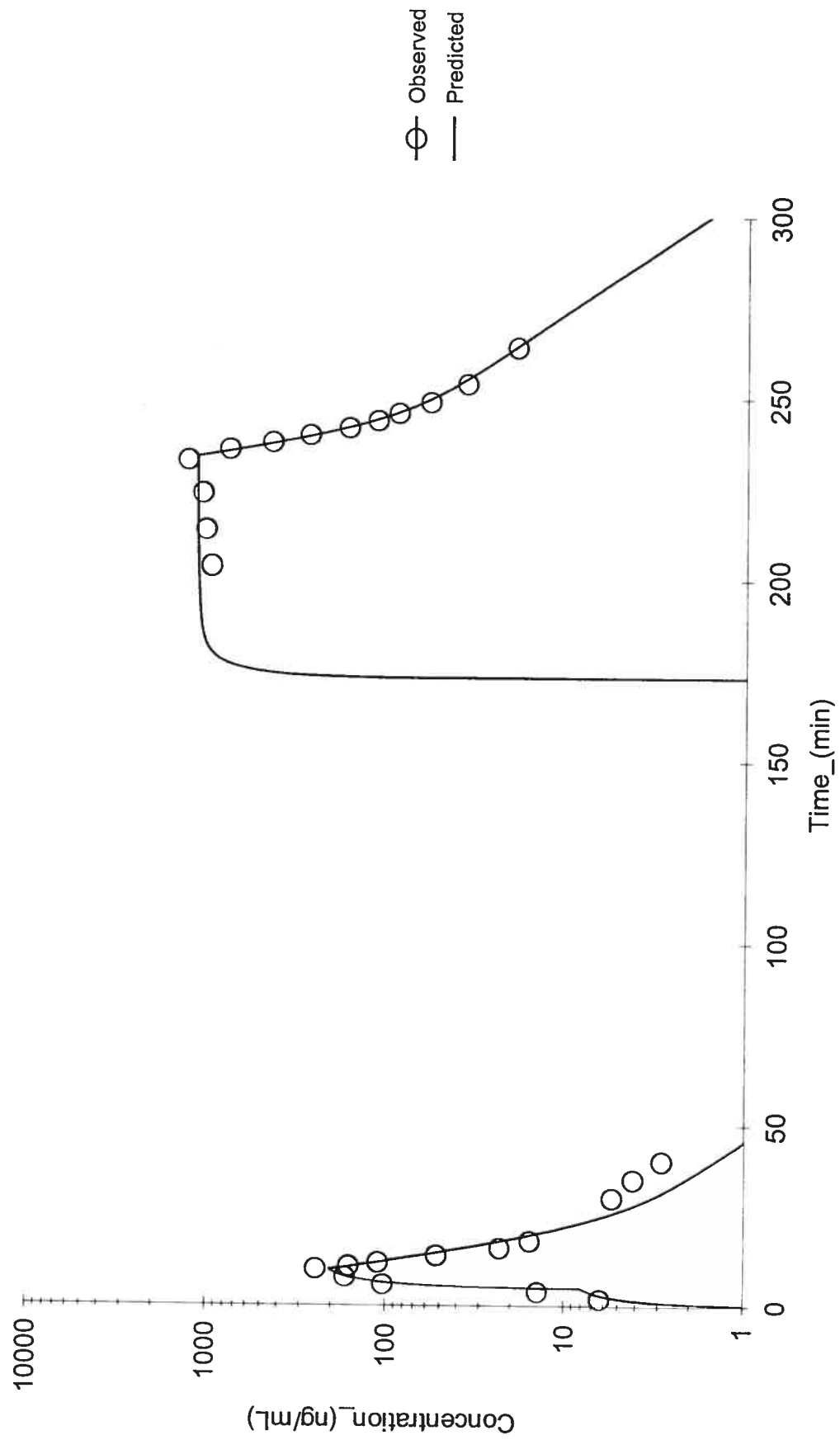
Chien #2



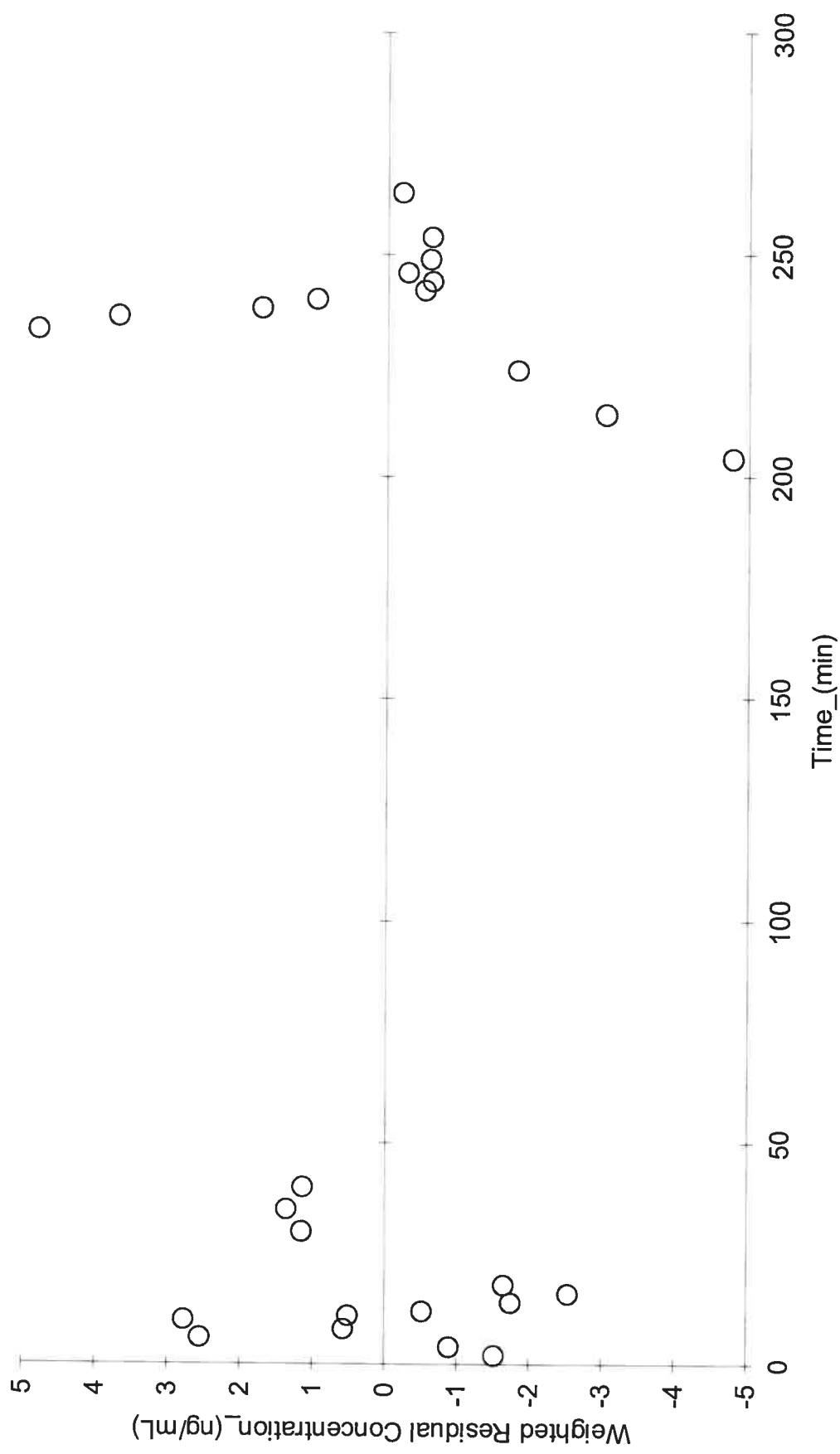




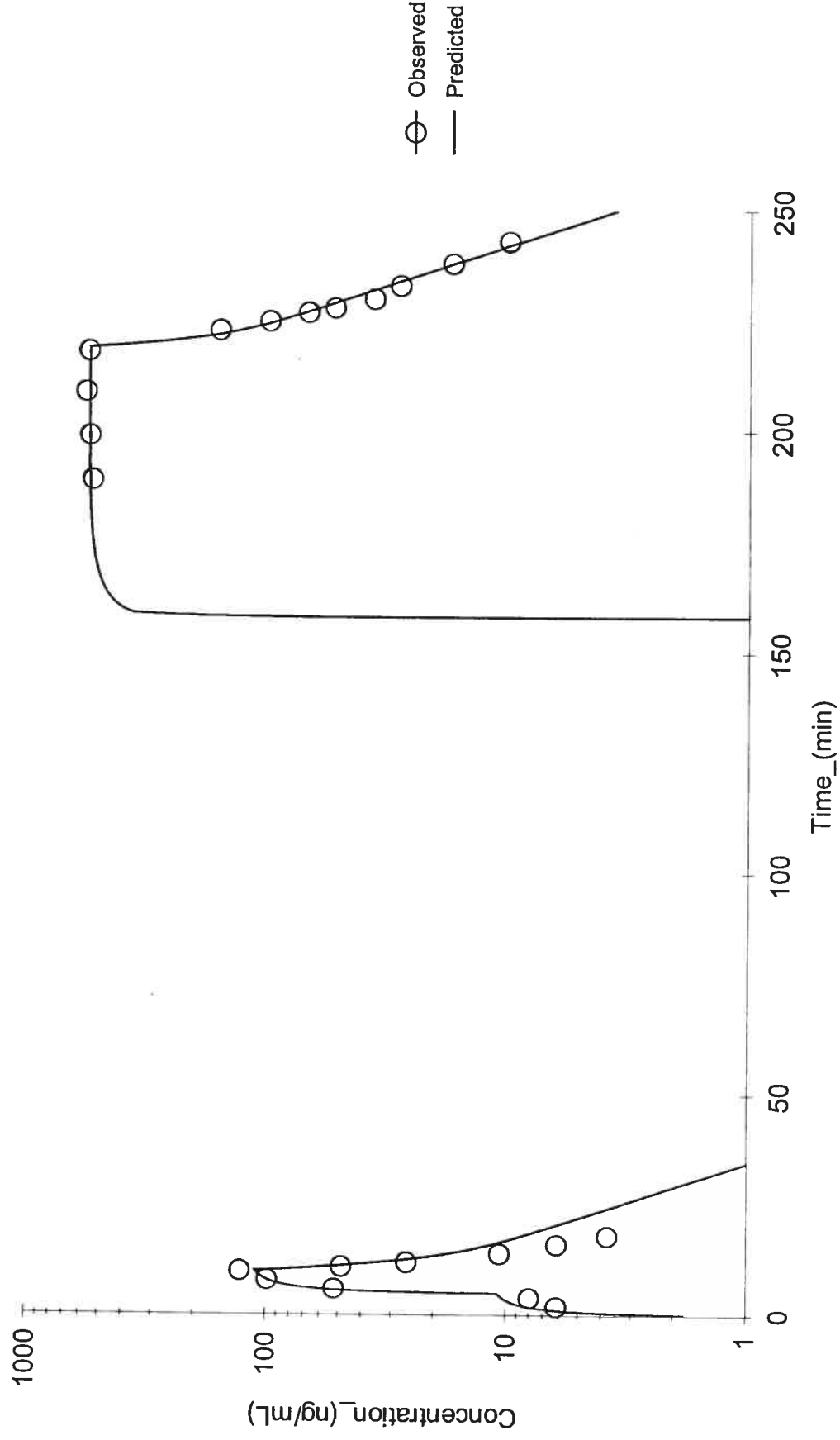
### Chien #3



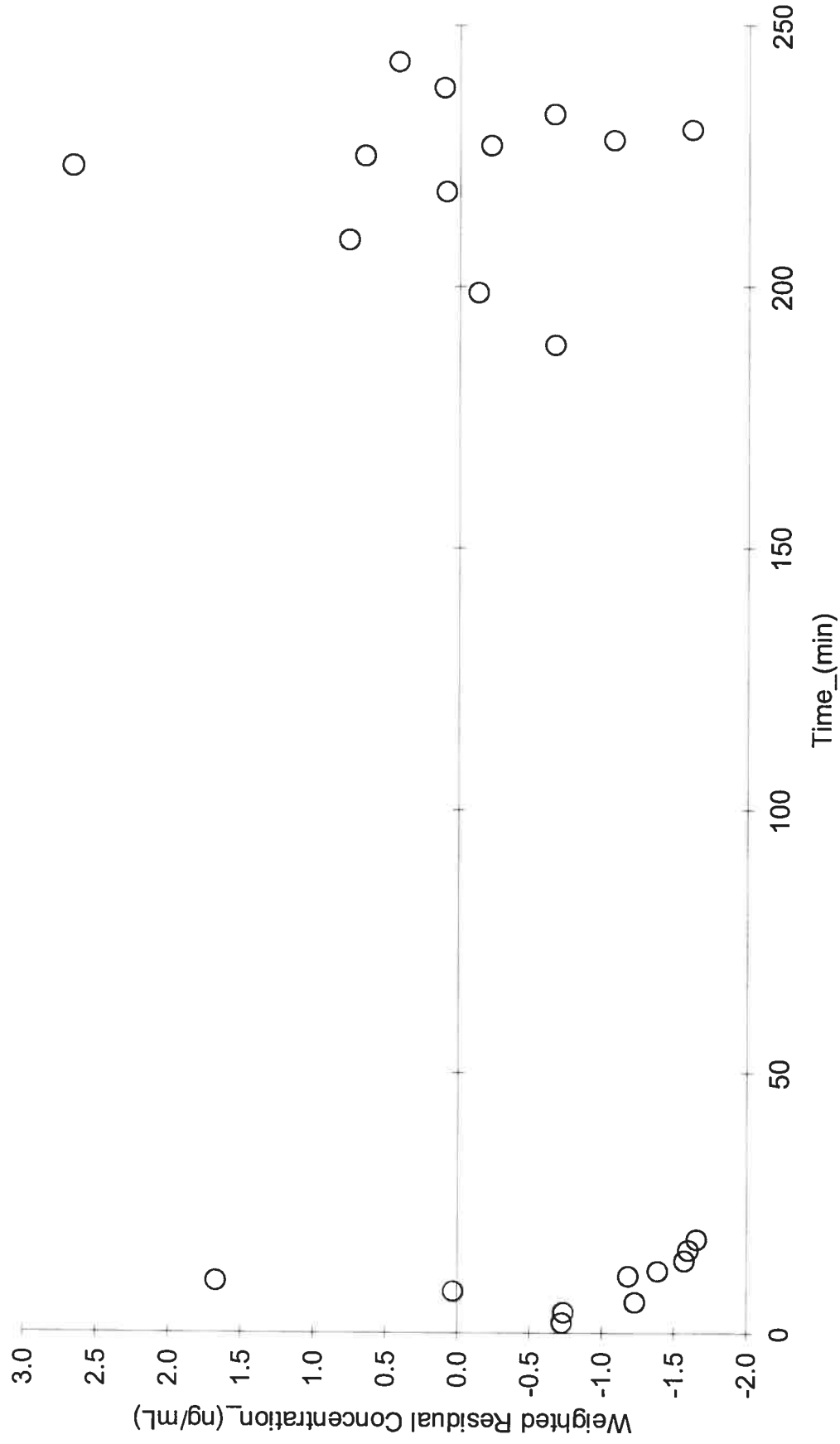
Chien #3



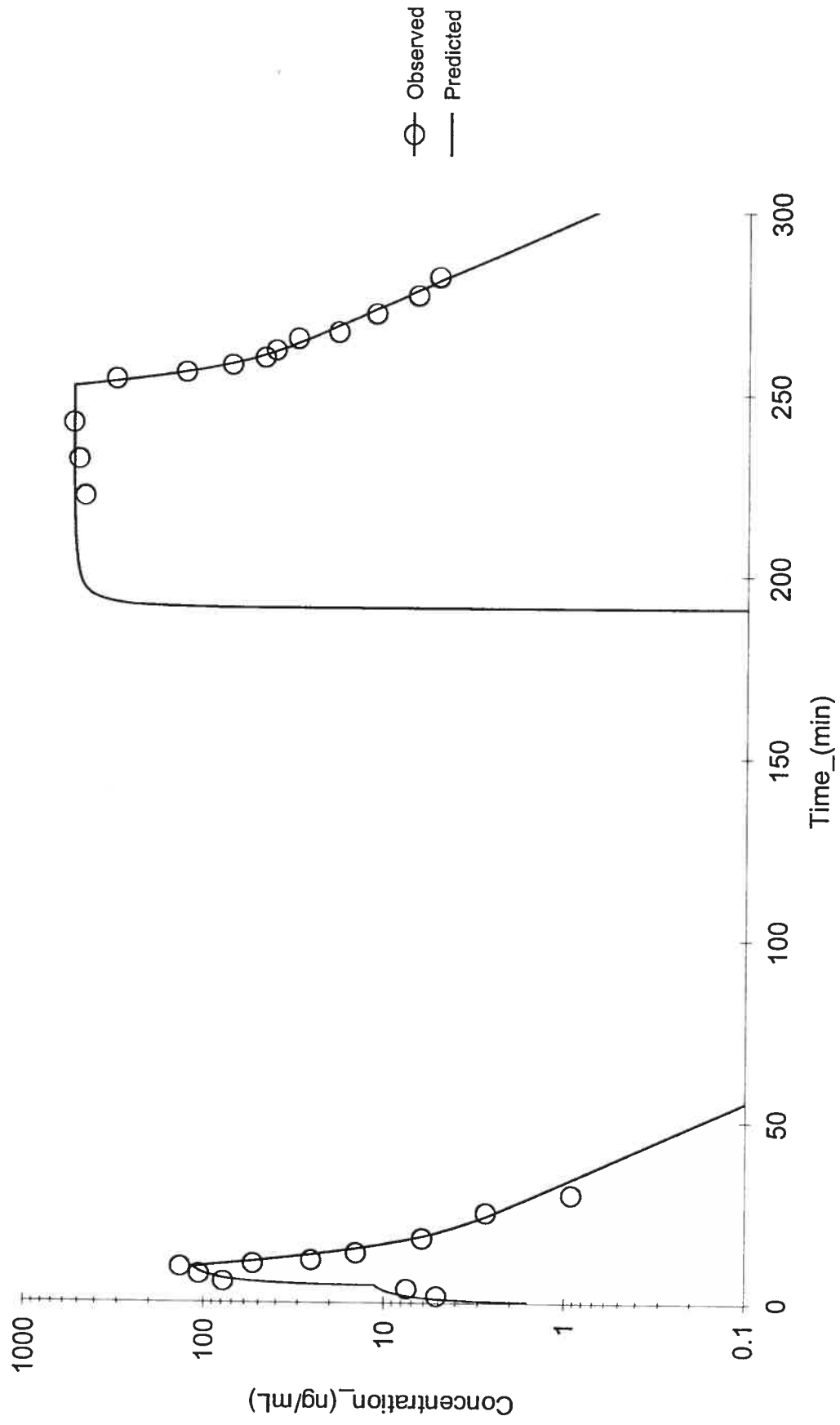
# Chien #4



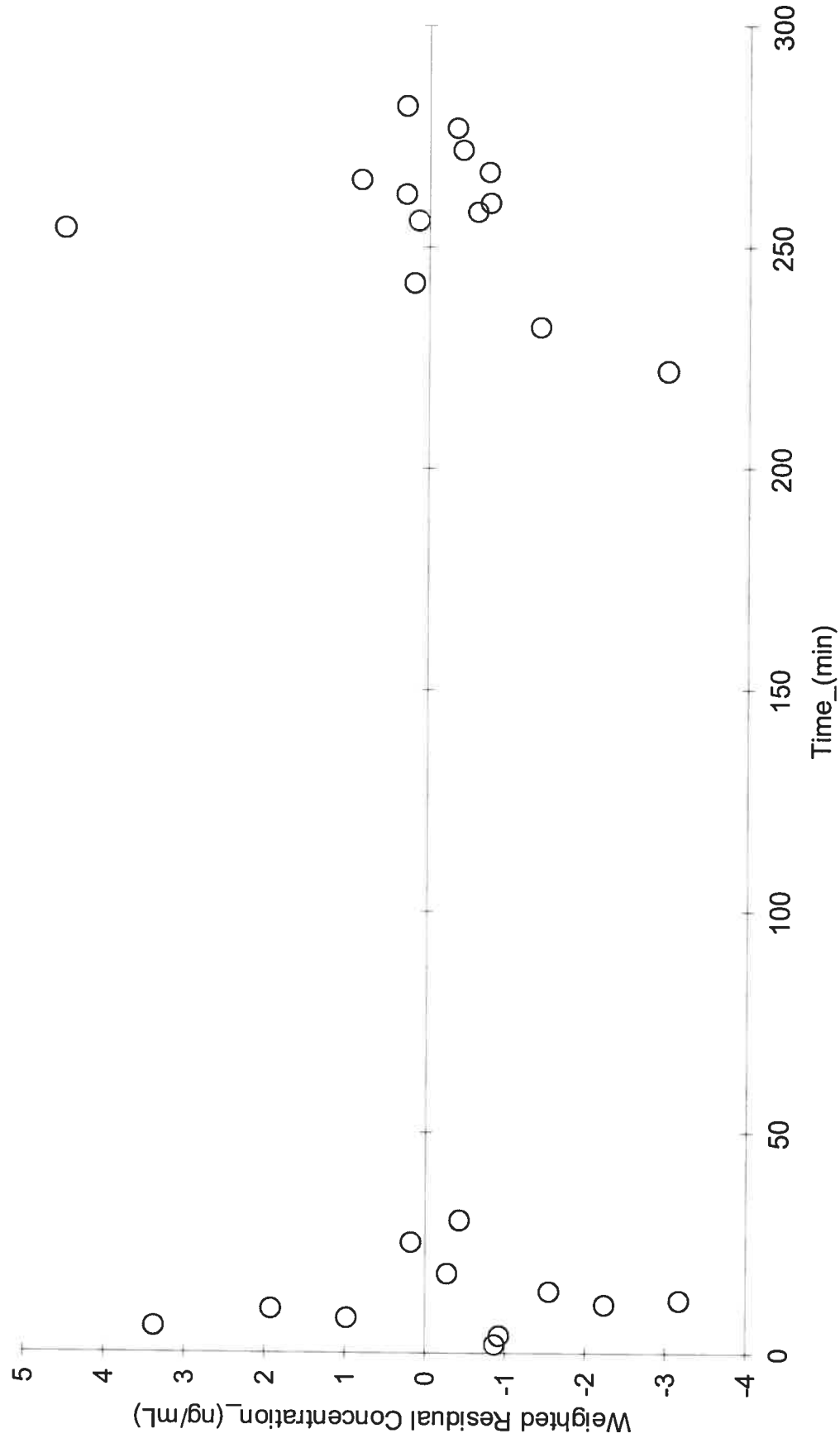
# Chien #4



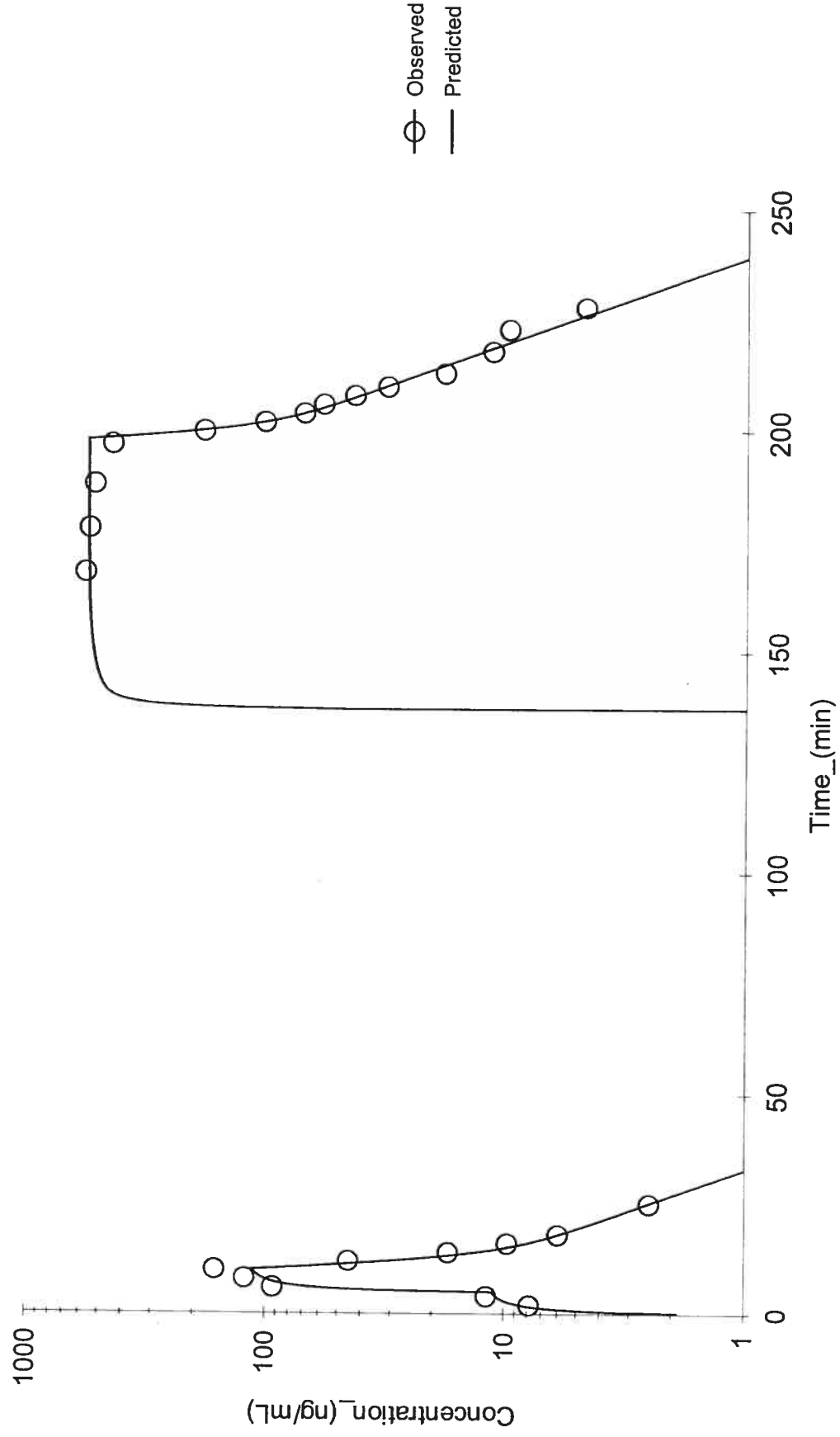
Chien #5



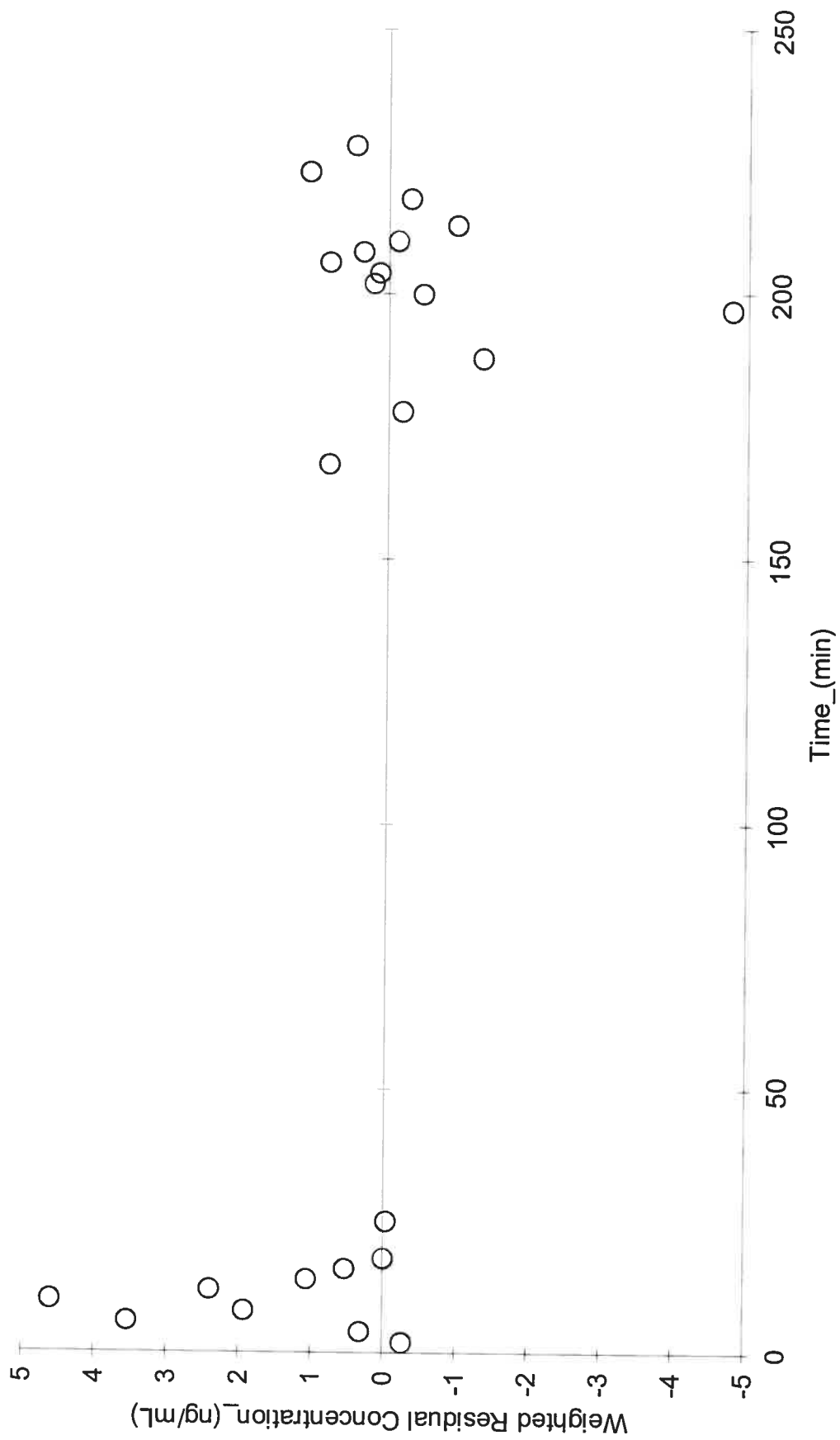
Chien #5



# Chien #6

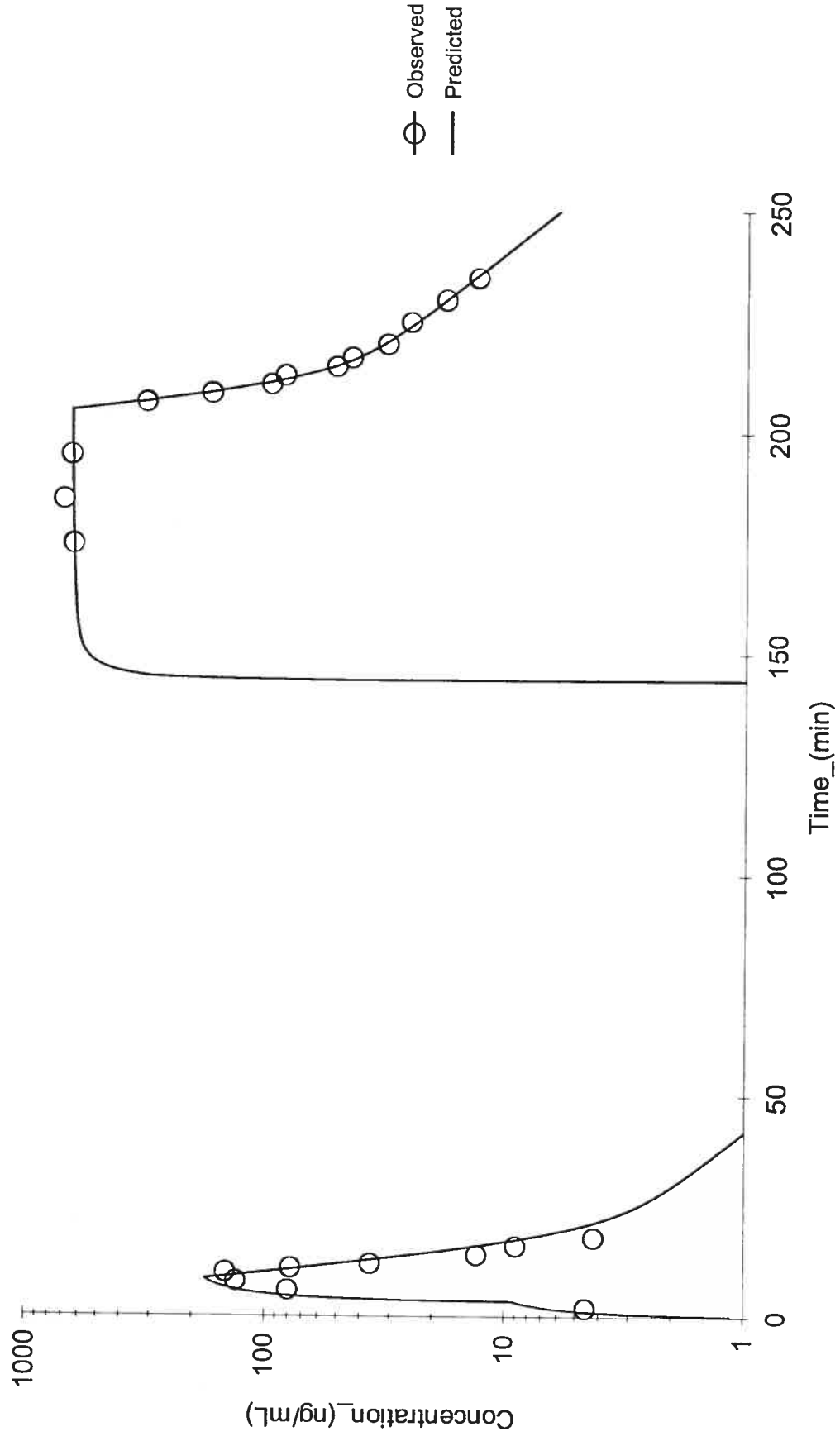


Chien #6

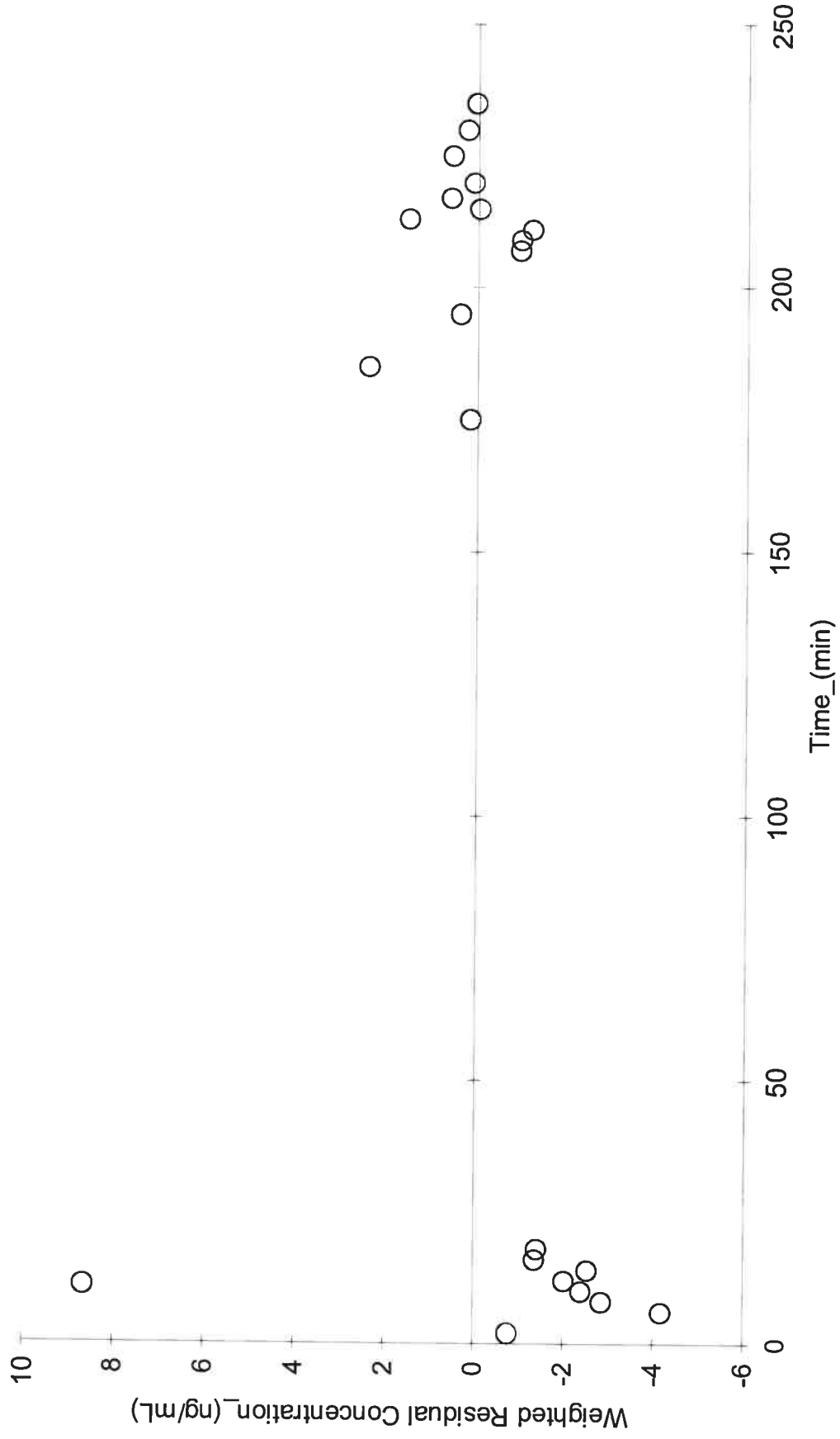




Chien #7



Chien #7

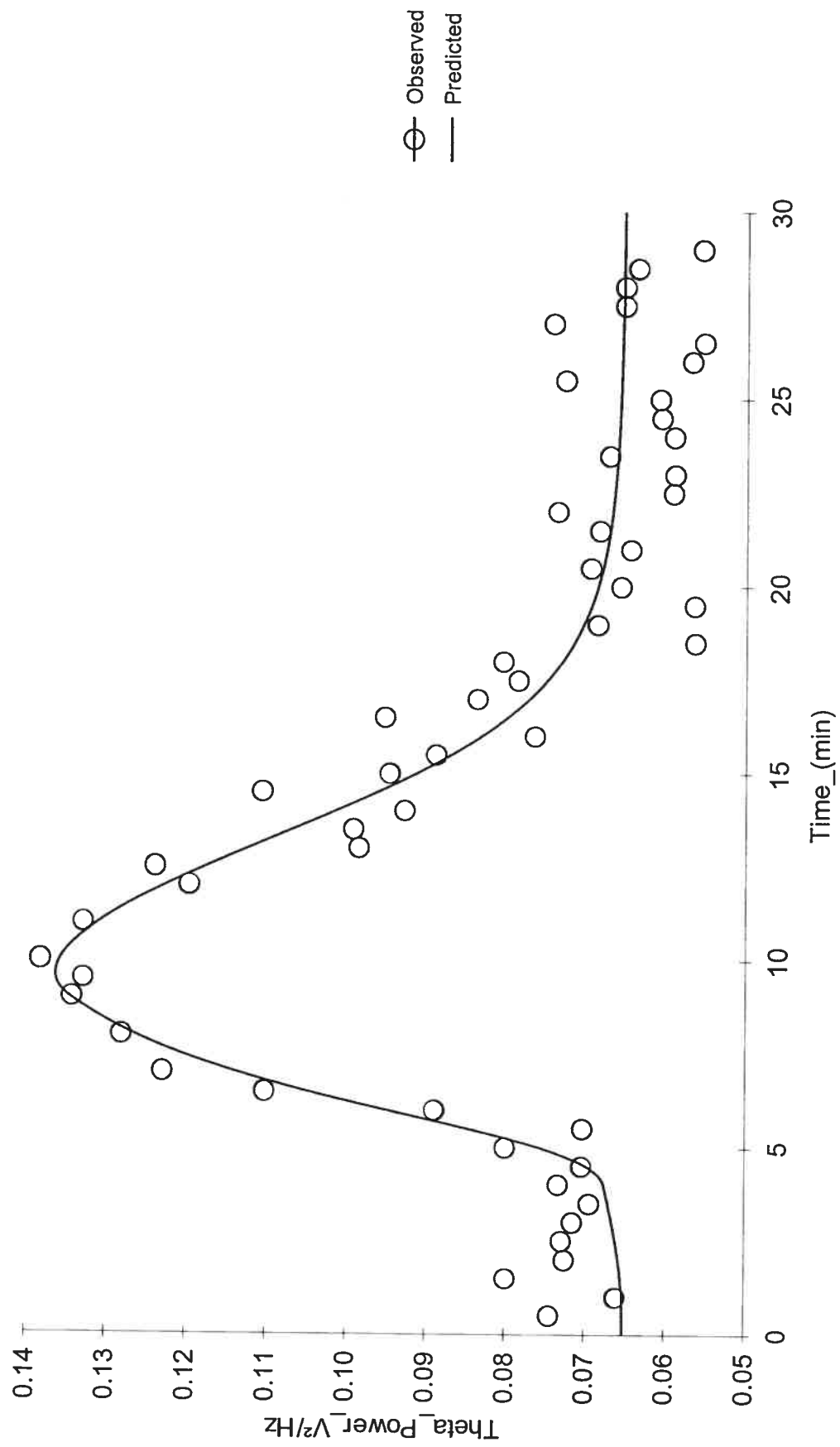


**ANNEXE IV**  
**Modélisation Pharmacodynamique**  
Données observées / prédites  
Graphiques des résiduelles en fonction du temps

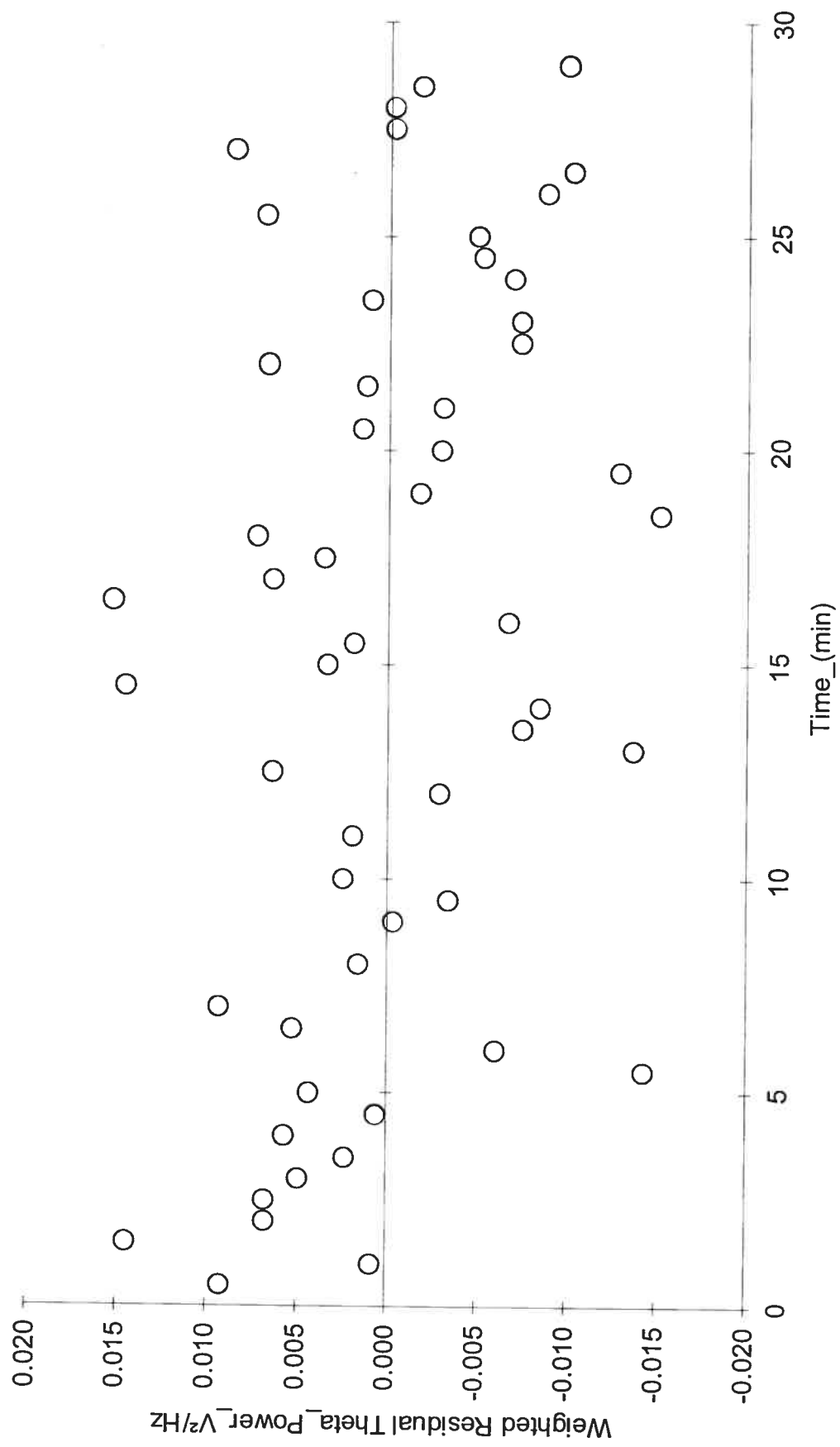


Université de Montréal

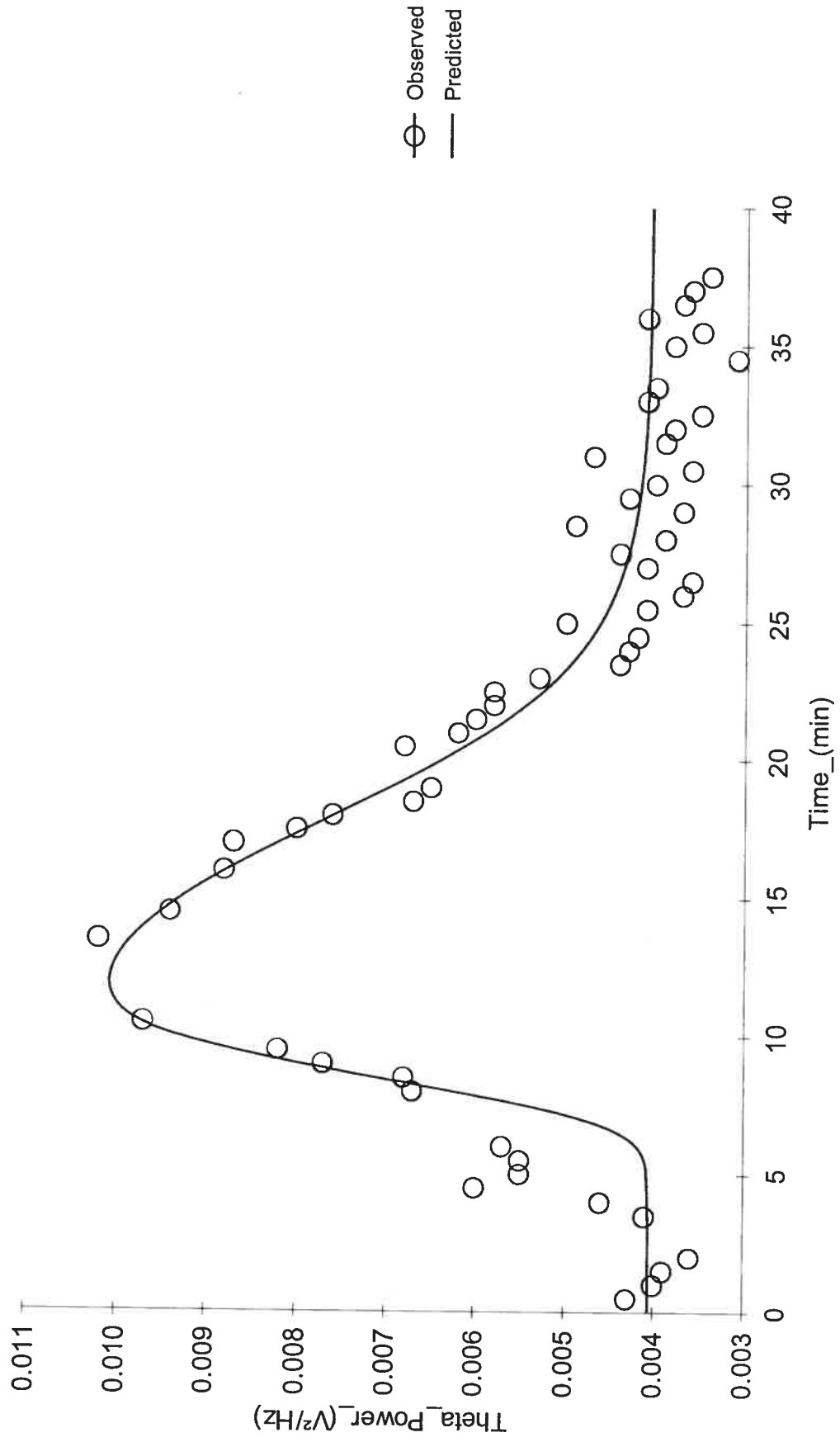
Chien #1



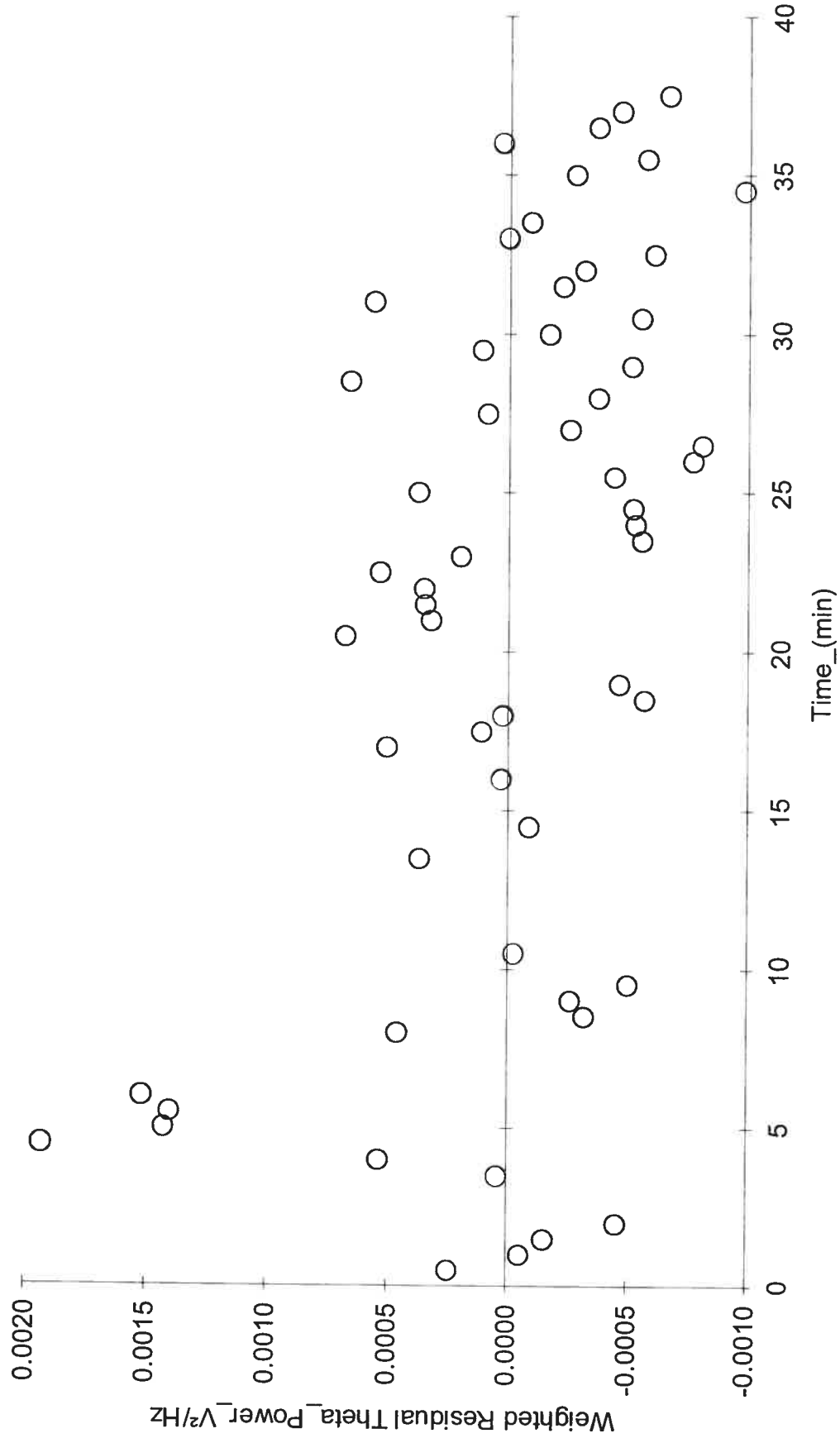
# Chien #1



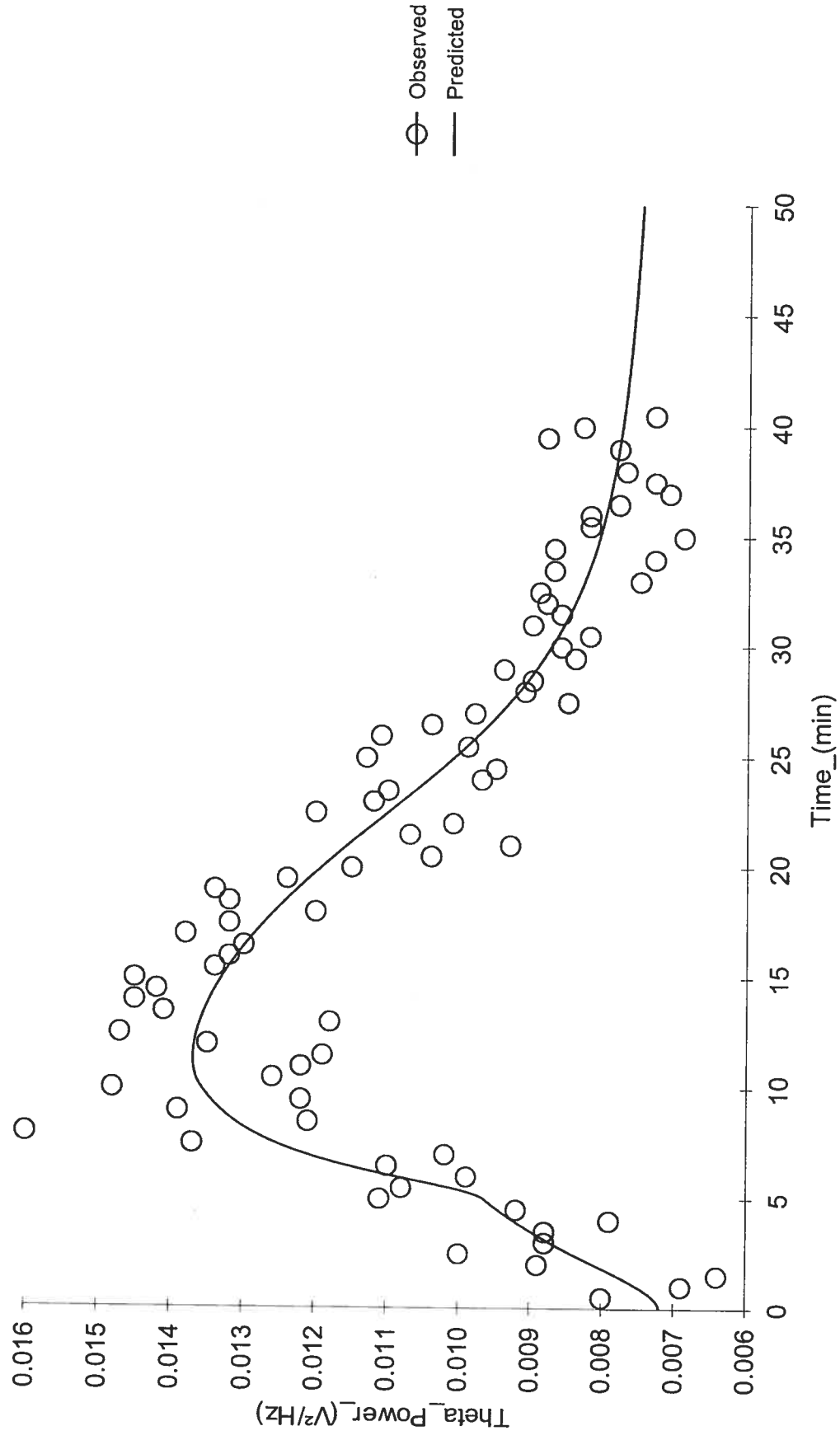
# Chien #2



# Chien #2

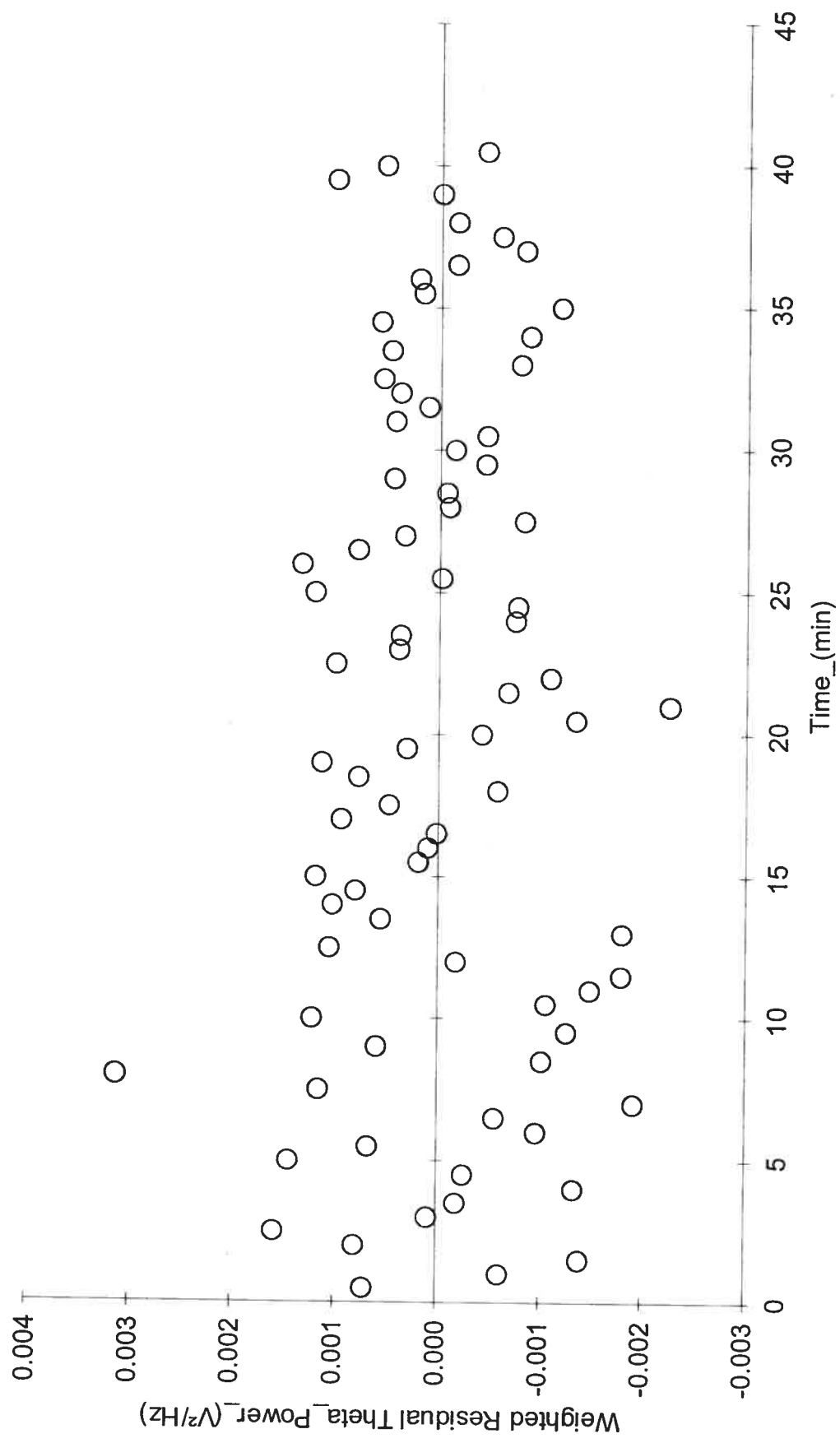


# Chien #3

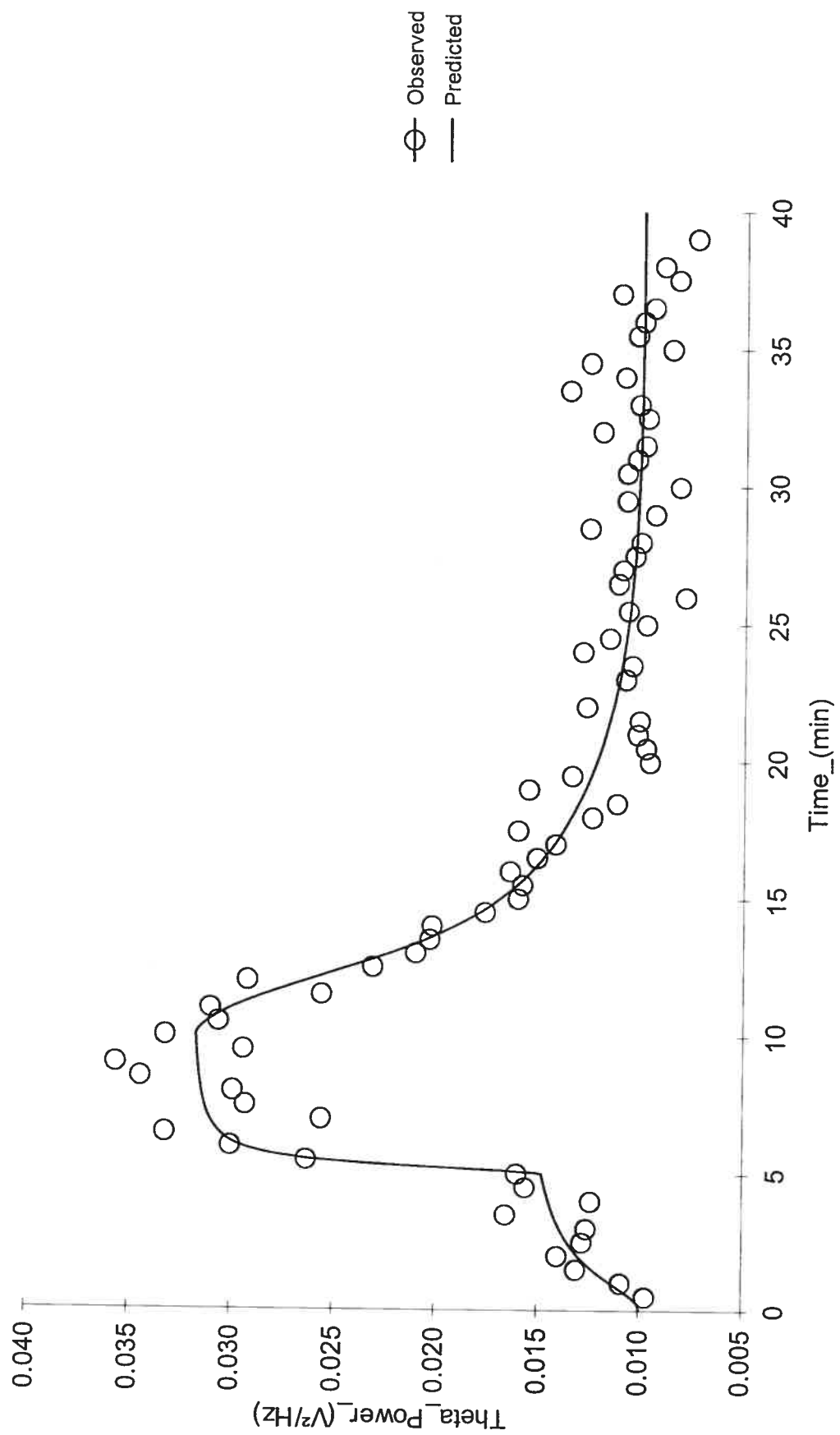




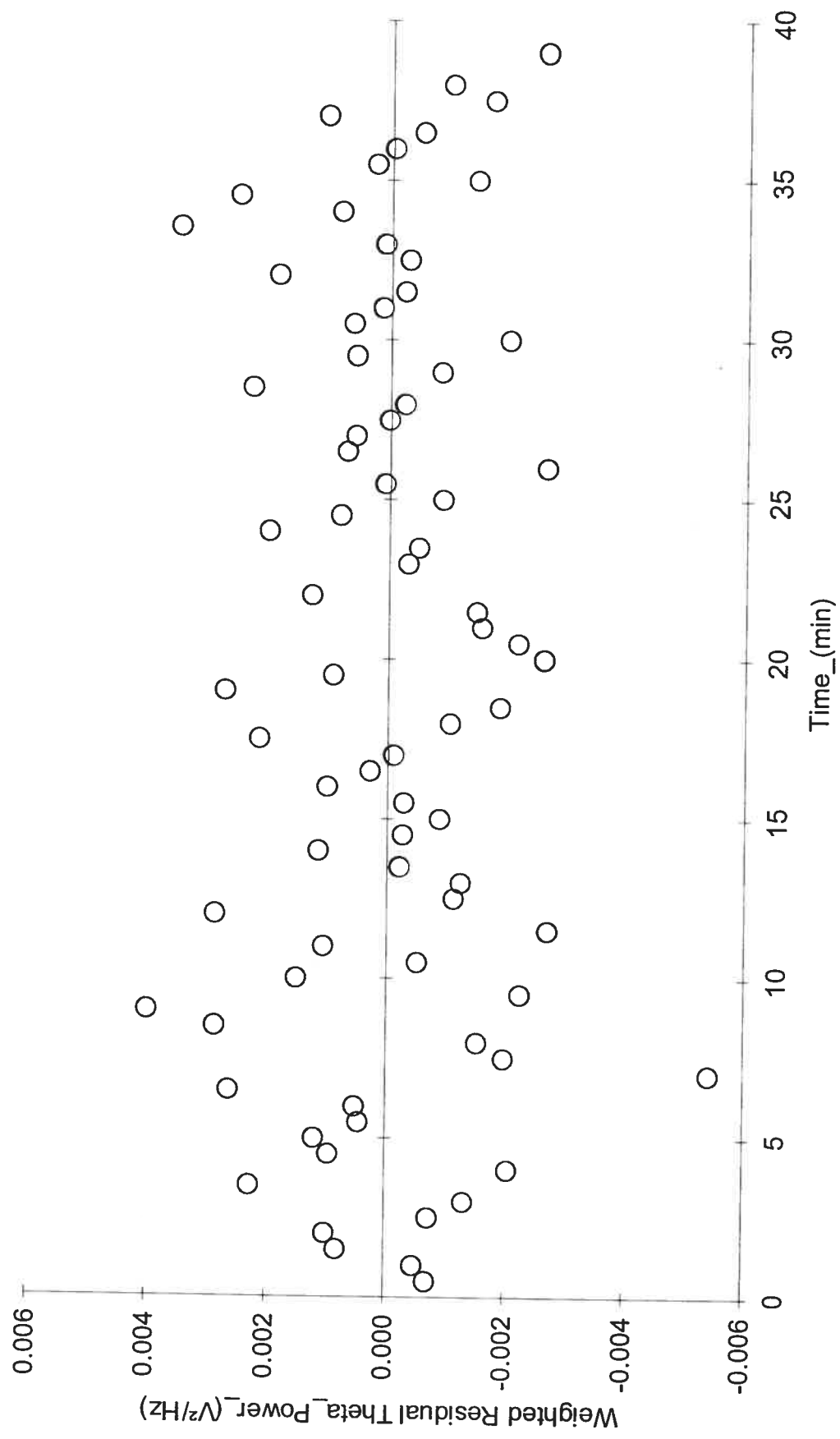
Chien #3



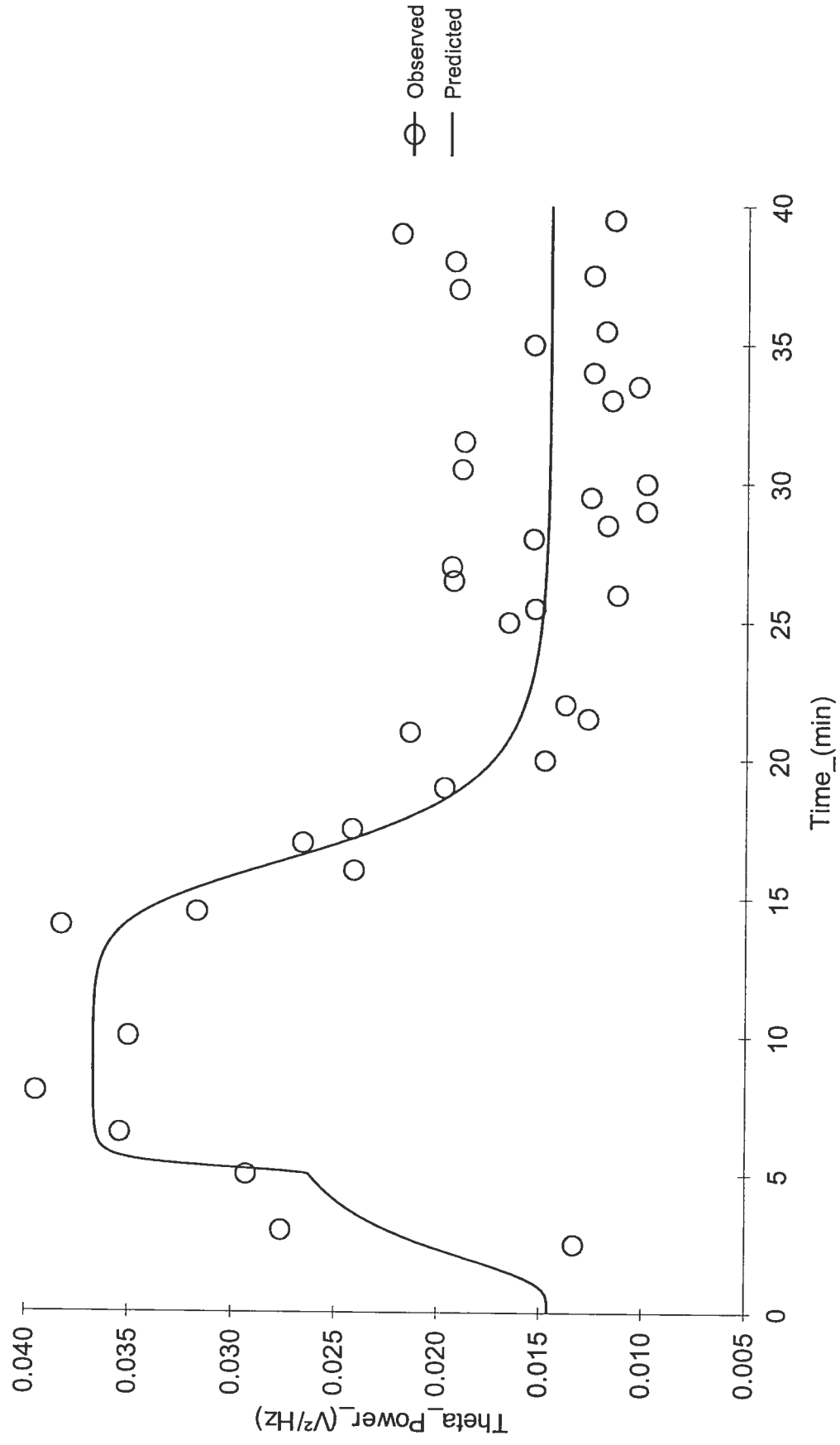
# Chien #4



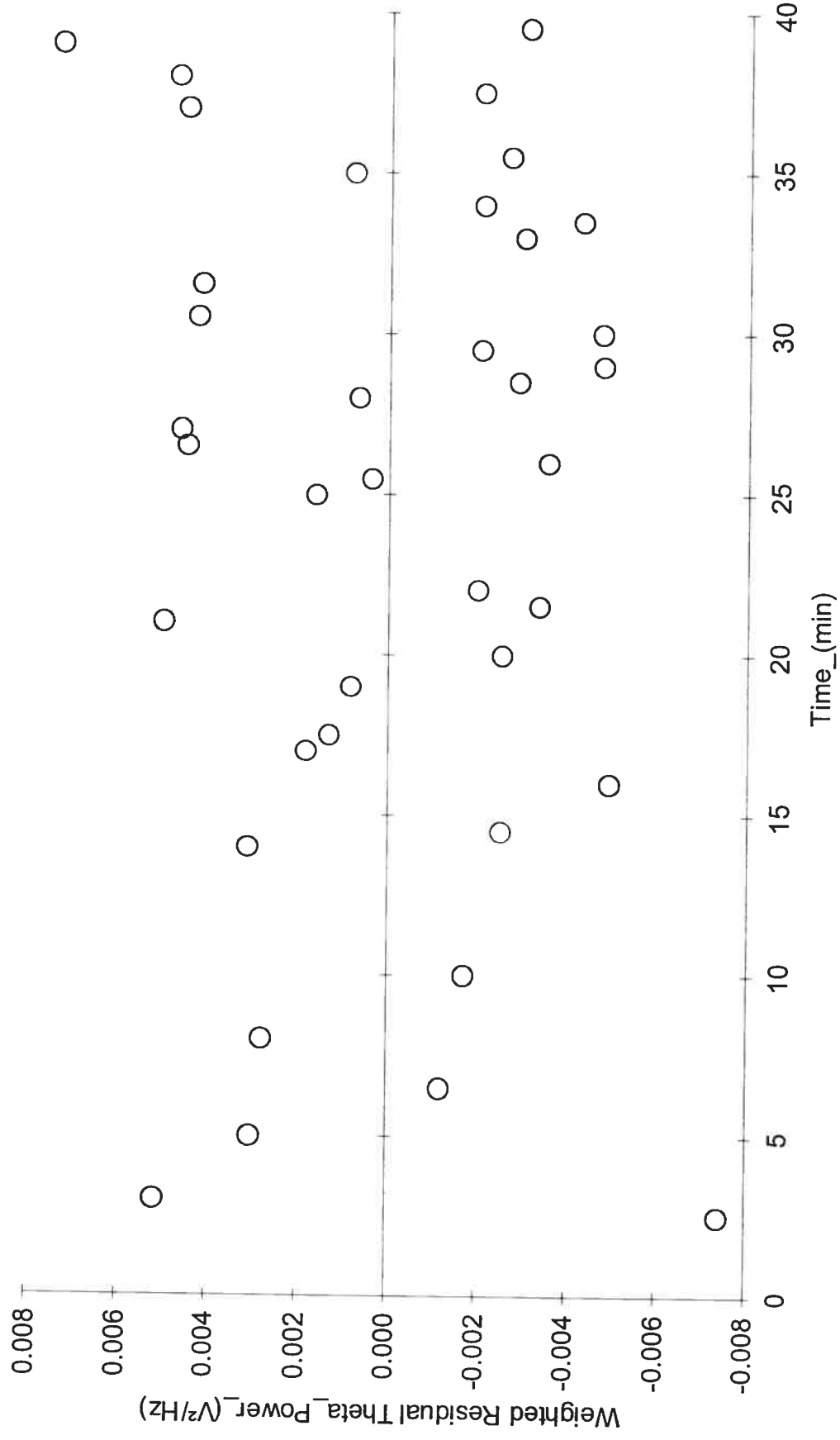
Chien #4



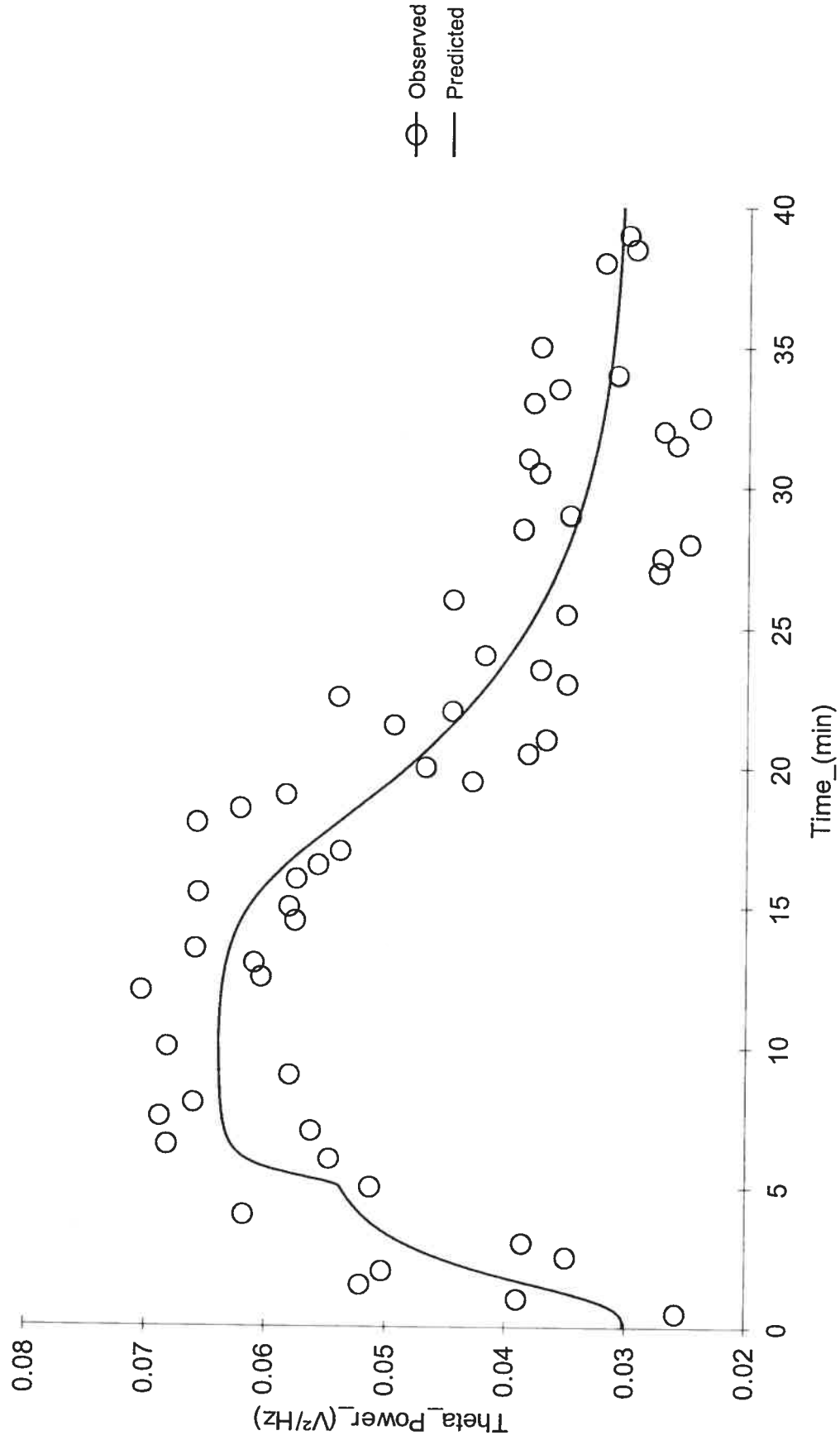
# Chien #5



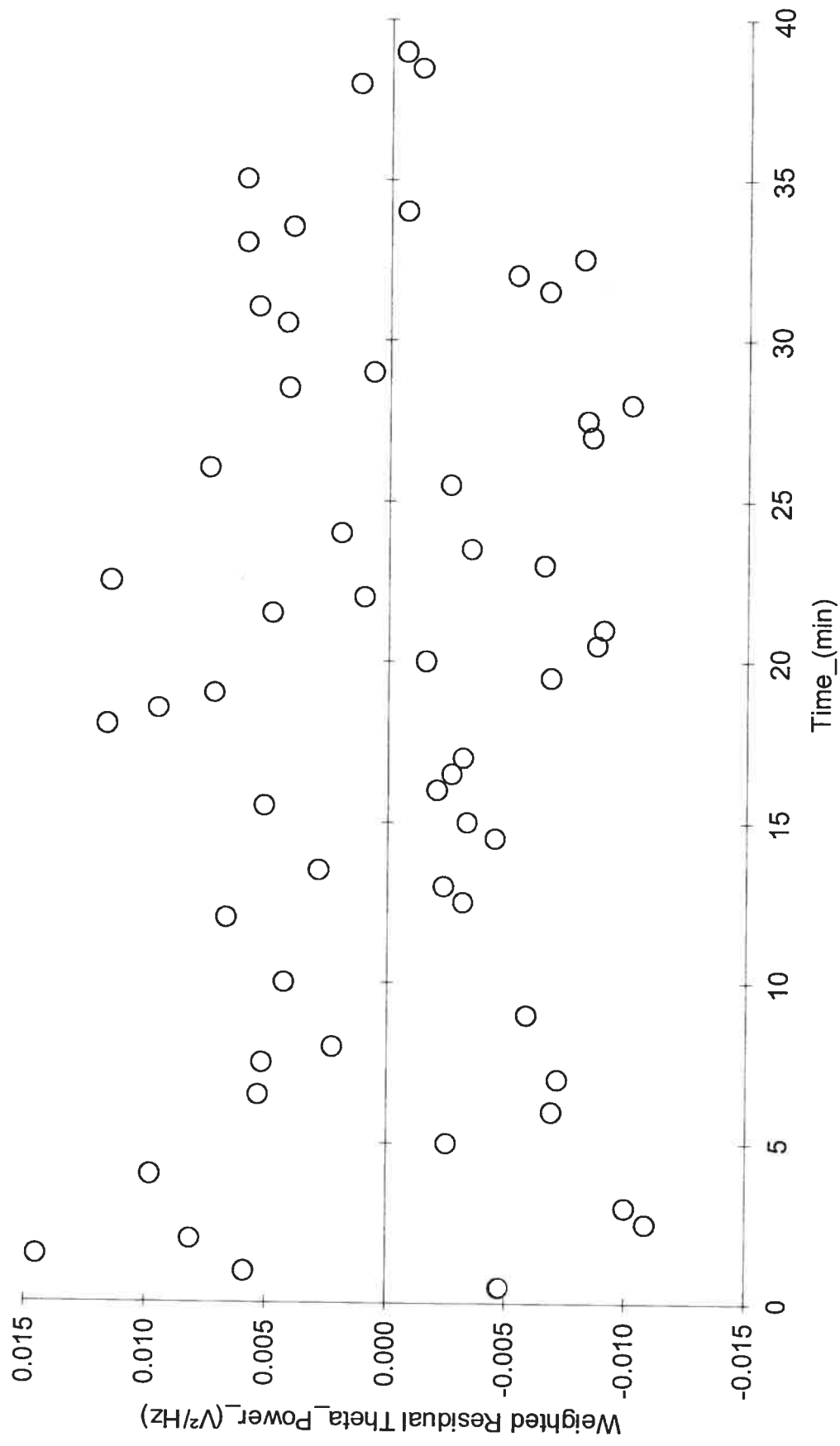
Chein #5



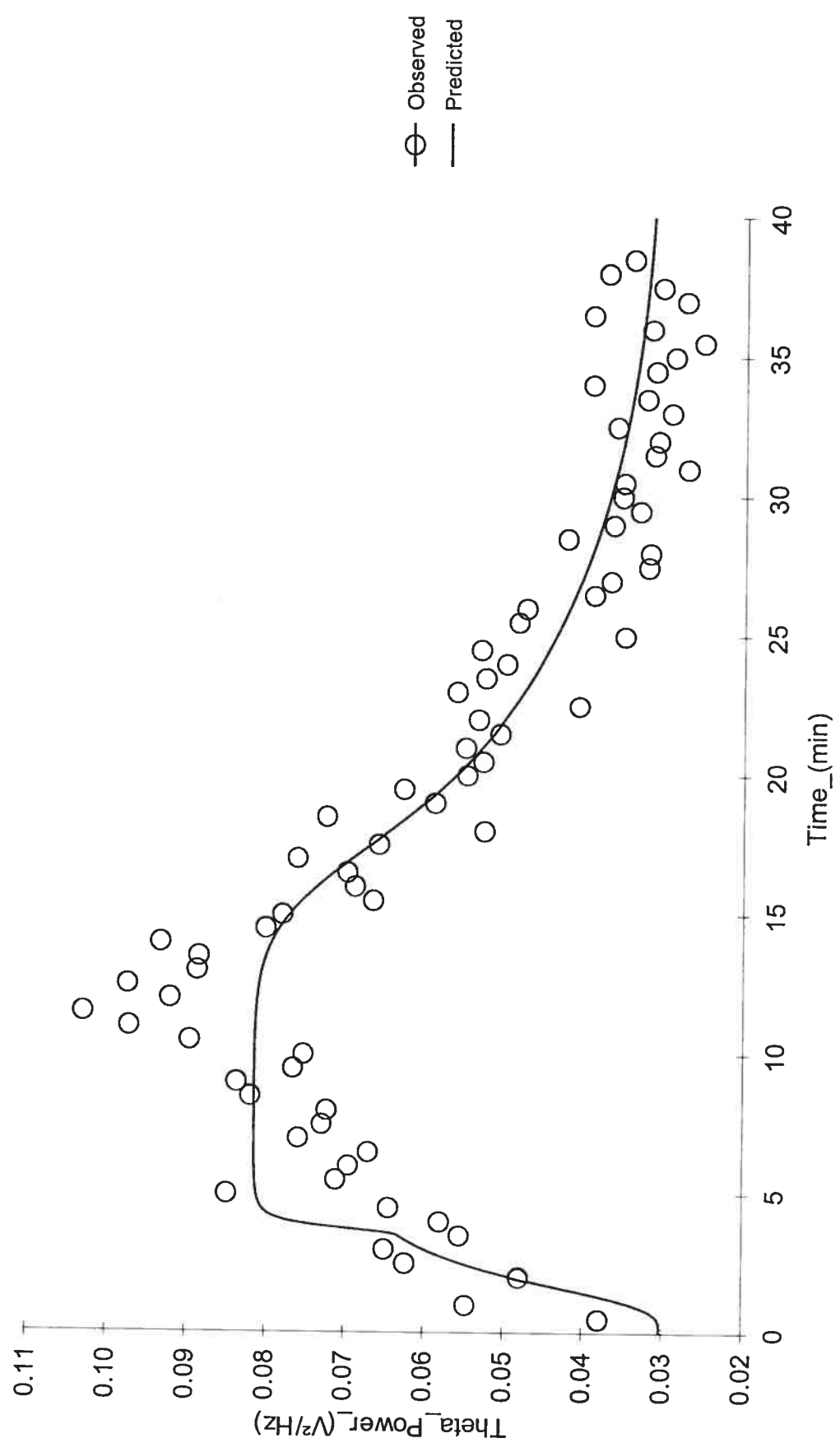
Chien #6



Chien #6

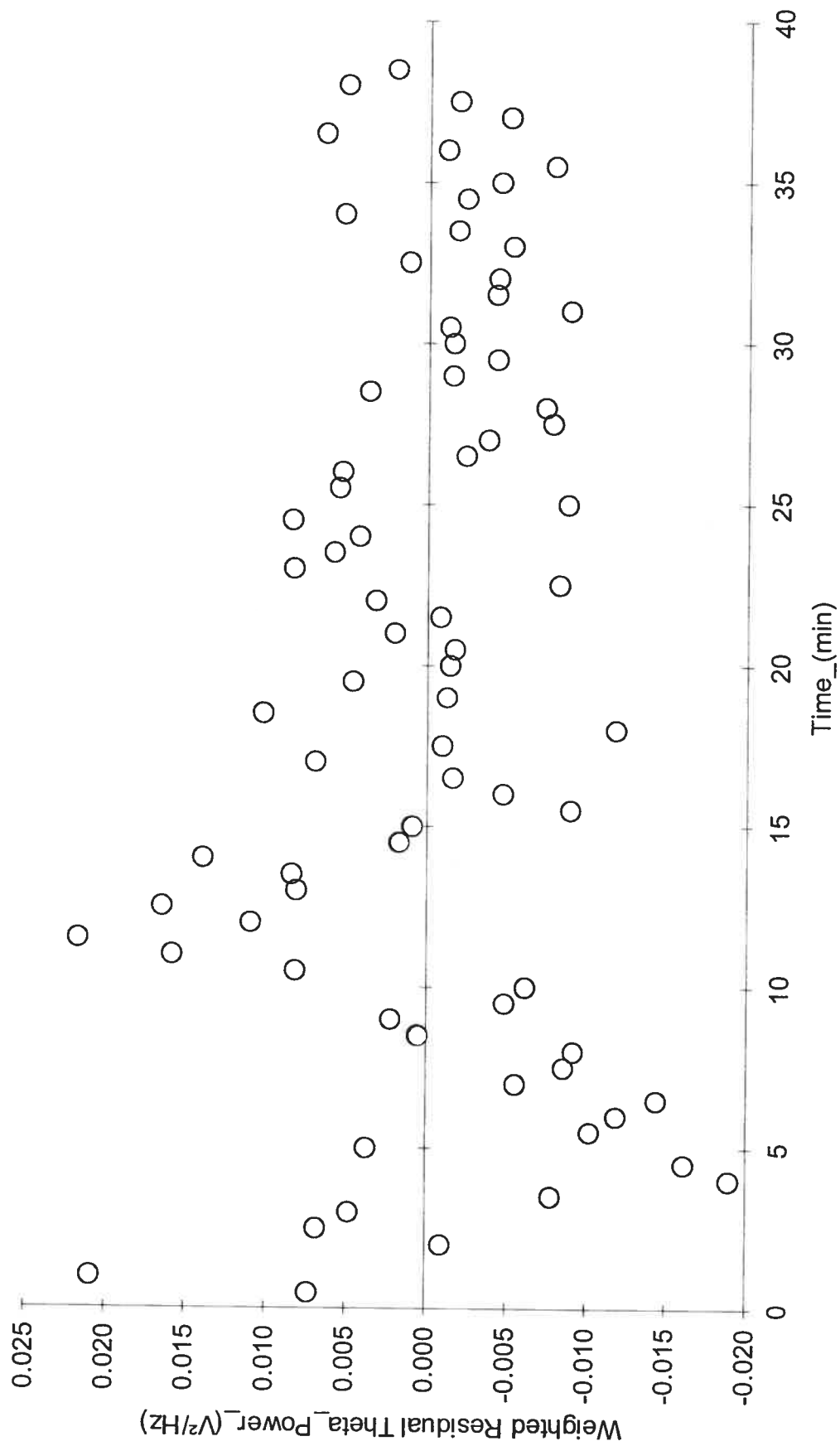


Chien #7





Chien #7



## **ANNEXE V**

### **Statistiques Descriptives et Erreur Standard liée aux Paramètres PK et PD**



Table 3. Remifentanyl pharmacokinetic parameters (standard error) in pentobarbital anaesthetized dogs

Dogs	Descriptive curve parameters				AIC	Microconstants			PK parameters		
	A	B	$\alpha$	$\beta$		$k_{10}$	$k_{12}$	$k_{21}$	$V_1$	$Cl$	$V_{ss}$
	ng ml <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	ng ml <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>		min <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>	min <sup>-1</sup>	ml kg <sup>-1</sup>	ml min <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup>	ml kg <sup>-1</sup>
1	12.80 (0.890)	0.28 (0.217)	0.449 (0.0540)	0.087 (0.0217)	58	0.395 (0.0291)	0.042 (0.0175)	0.099 (0.0291)	180 (16.9)	71 (1.74)	256 (16.0)
2	15.88 (1.35)	0.88 (0.516)	0.413 (0.0581)	0.092 (0.0214)	101	0.349 (0.0306)	0.047 (0.0205)	0.109 (0.0320)	131 (12.7)	46 (1.14)	187 (11.2)
3	35.48 (2.99)	0.93 (1.34)	0.296 (0.0415)	0.061 (0.0372)	131	0.269 (0.0225)	0.021 (0.0137)	0.067 (0.0451)	133 (12.5)	36 (1.05)	175 (16.9)
4	38.07 (6.36)	3.11 (0.832)	0.865 (0.182)	0.129 (0.0154)	83	0.605 (0.0969)	0.204 (0.0757)	0.185 (0.0340)	117 (19.0)	71 (1.72)	245 (15.4)
5	29.52 (3.83)	1.97 (1.25)	0.532 (0.108)	0.115 (0.0295)	110	0.434 (0.0570)	0.072 (0.0400)	0.141 (0.0483)	159 (23.1)	69 (2.73)	239 (21.2)
6	37.57 (6.69)	1.76 (0.863)	0.801 (0.170)	0.118 (0.0232)	111	0.636 (0.102)	0.133 (0.0618)	0.148 (0.0388)	120 (20.3)	77 (2.80)	228 (20.7)
7	26.46 (3.00)	0.79 (0.407)	0.551 (0.0600)	0.077 (0.0149)	88	0.467 (0.0384)	0.069 (0.0200)	0.091 (0.0206)	152 (14.1)	71 (1.966)	269 (18.8)
Arithmetic Mean	27.97	1.39	0.558	0.097		0.451	0.084	0.120	142	63	228
S.D.	10.26	0.96	0.206	0.025		0.132	0.064	0.040	23	16	35
Arithmetic C.V. (%)	37	69	37	25		29	76	33	16	25	15
Geometric Mean	26.0	1.10	0.526	0.0942		0.434	0.0662	0.114	140	61.0	226
Geometric C.V. (%)	45.7	92.4	38.8	27.1		30.9	87.4	35.3	15.9	29.4	16.3

A,  $\alpha$ , coefficient and initial distribution rate constant; B,  $\beta$ , coefficient and terminal elimination rate constant;  $k_{10}$ , elimination rate constant from compartment I;  $k_{12}$ , transfer rate constant from the first to the second compartment;  $k_{21}$ , transfer rate constant from the second to the first compartment;  $V_1$ , apparent volume of distribution in the central compartment;  $Cl$ , total body clearance;  $V_{ss}$ , apparent volume of distribution at steady state.

Table 2. Remifentanyl pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters (standard error) in pentobarbital anaesthetized dogs

Dogs	E <sub>0</sub> (V <sup>2</sup> Hz <sup>-1</sup> )		Emax (V <sup>2</sup> Hz <sup>-1</sup> )		K <sub>e0</sub> min <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> ng ml <sup>-1</sup>	γ	AIC
	Observed	Estimated	Observed	Estimated				
1	0.073 (0.00200)	0.065 (0.00200)	0.140 (0.00387)	0.170 (0.00387)	0.44 (0.0456)	29 (12.7)	1.71 (0.506)	-305
2	0.004 (0.000131)	0.004 (0.000131)	0.010 (0.00239)	0.012 (0.00239)	0.15 (0.0118)	24 (5.60)	2.67 (0.685)	-607
3	0.008 (0.000542)	0.007 (0.000542)	0.014 (0.00156)	0.015 (0.00156)	0.23 (0.0273)	32 (12.3)	1.12 (0.395)	-751
4	0.011 (0.000446)	0.010 (0.000446)	0.035 (0.00391)	0.038 (0.00391)	0.75 (0.0783)	38 (8.95)	1.43 (0.233)	-626
5	0.013 (0.00103)	0.014 (0.00103)	0.039 (0.00277)	0.037 (0.00277)	0.80 (0.292)	12 (3.36)	2.15 (0.739)	-277
6	0.039 (0.000295)	0.030 (0.000295)	0.070 (0.00237)	0.063 (0.00237)	0.50 (0.0990)	5 (1.00)	1.85 (0.640)	-332
7	0.038 (0.00454)	0.029 (0.00454)	0.100 (0.00265)	0.083 (0.00265)	0.52 (0.0754)	6 (0.968)	1.58 (0.394)	-398
Arithmetic								
Mean	0.027	0.023	0.058	0.060	0.48	21	1.79	
S.D.	0.025	0.021	0.048	0.055	0.24	13	0.51	
Arithmetic	94	94	82	92	50	63	28	
C.V. (%)								
Geometric								
Mean	0.0175	0.0156	0.0408	0.0419	0.422	16.3	1.73	
Geometric								
C.V. (%)	138	123	127	118	67.5	99.7	28.7	

K<sub>e0</sub>, effect compartment equilibration rate constant; EC<sub>50</sub>, effect compartment concentration at 50 % of maximal observed effect; gamma, slope factor.